

**T.C**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇANLARDA BENOMİL TOKSİSİTESİNE KARŞI**  
**KONDROİTİN-4-SÜLFAT (C4S) VE**  
 **$\alpha$ -LİPOİK ASİDİN (LA) KORUYUCU ETKİLERİ**

**Seda BALKAN**

**DOKTARA TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Tülin AKTAÇ**

**2010-EDİRNE**

## ÖZET

Bu çalışmada, fungusit olarak kullanılan benomil'in karaciğer ve böbrek dokuları üzerindeki etkileri ile andioksidan olarak kullanılan  $\alpha$ -lipoik asit'in ve kondroitin-4-sülfat karaciğer ve böbrek dokuları üzerindeki koruyucu etkileri incelendi.

Benomil (200 mg/kg),  $\alpha$ -lipoik asit (200 mg/kg) ve kondroitin-4-sülfat (25 mg/kg) 5 hafta boyunca haftada bir kez olmak üzere intraperitoneal (IP) enjeksiyon yoluyla uygulandı.

Deney öncesi ve deney sonu hayvanların vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında, kontrol, benomil+ $\alpha$ -lipoik asit, benomil+ kondroitin-4-sülfat ve benomil+ $\alpha$ -lipoik asit+kondroitin-4-sülfat gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ( $p<0.005$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.02$ ), benomil grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi.

Dalak ağırlığında kontrol grubu ile benomil grubu karşılaştırıldığında, benomil grubunda anlamlı azalma tespit edilmiş ( $p<0.001$ ), diğer gruplarda ise anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Testis ağırlığında, benomil grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ( $p<0.001$ ), ve üç deney grubu ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p<0.01$ ). tüm gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında karaciğer, böbrek ve kalp ağırlıklarında herhangi bir değişim saptanmadı.

Kontrol grubu ile benomil grubu karşılaştırıldığında benomil grubundaki hayvanların aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz ve laktat dehidrogenaz düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu bulundu ( $p<0.005$ ). benomil grubu ile benomil+ $\alpha$ -lipoik asit, benomil+kondroitin-4-sülfat, benomil+ $\alpha$ -lipoik asit+kondroitin-4-sülfat grupları karşılaştırıldığında ise bu üç deney grubundaki hayvanların enzim değerleri önemli olarak azaldığı görüldü ( $p<0.005$ ). Serum gamma-glutamil transferaz düzeyleri incelendiğinde ise tüm gruplarda anlamlı bir değişiklik gözlenmedi.

Benomil grubundaki sıçanların kontrol gruplarındakilere göre karaciğer, böbrek ve serum malondialdehid değerlerinde anlamlı bir artış saptandı ( $p<0.032$ ,  $p<0.001$ ).

Benomil+ $\alpha$ -lipoik asit, benomil+kondroitin-4-sülfat ve benomil+ $\alpha$ -lipoik asit+kondroitin-4-sülfat gruplarındaki hayvanların böbrek serum malondialdehid değerleri benomil grubu ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir azalış, benomil+ $\alpha$ -lipoik asit+kondroitin-4-sülfat grubundaki serum malondialdehid değeri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında da anlamlı bir azalış tespit edildi ( $p<0.001$ ,  $p<0.01$ ).

Hem karaciğer hem böbrek dokularında süperoksid dismütaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalaz aktiviteleri, kontrol grubu ile benomil grubu karşılaştırıldığında benomil grubunda anlamlı bir azalış, benomil grubu ile benomil+ $\alpha$ -lipoik asit, benomil+kondroitin-4-sülfat ve benomil+ $\alpha$ -lipoik asit+ kondroitin-4-sülfat grupları karşılaştırıldığında ise üç grupta da anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0.05$ ). Kontrol grubu ile benomil+ $\alpha$ -lipoik asit+kondroitin-4-sülfat grubundaki hayvanlar karşılaştırıldığında benomil+ $\alpha$ -lipoik asit+kondroitin-4-sülfat gruplarındakilerin süperoksid dismutaz karaciğer, süperoksid dismutaz böbrek, katalaz karaciğer ve katalaz böbrek enzim aktivitelerinde artış saptandı ( $p<0.05$ ).

Benomil uygulanmış sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında histopatolojik bulgular tespit edilmesine rağmen; benomil+ $\alpha$ -lipoik asit, benomil+kondroitin-4-sülfat ve benomil+ $\alpha$ -lipoik asit+kondroitin-4-sülfat grubundaki sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında kısmen bu patolojik bu patolojik bulguların düzeldiği gözlemlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Benomil,  $\alpha$ -lipoik asit, kondroitin-4-sülfat, antioksidan

**ABSTRACT**

In this study, effects of benomyl, which is used as fungicide, on liver and kidney tissue, the protective effects of  $\alpha$ -lipoic acid and chondroitin-4-sulphate, which are used as antioxidants, on liver and kidney tissues are examined.

Benomyl (200 mg/kg),  $\alpha$ -lipoic acid (200 mg/kg) and chondroitin-4-sulphate (25 mg/kg) are applied by intraperitoneal injection once in each week for a period of 5 weeks.

It was determined that body weights of animals in the groups of control, benomyl+  $\alpha$ -lipoic acid, benomyl+ chondroitin-4-sulphate and benomyl+ $\alpha$ -lipoic acid+ chondroitin-4-sulphate were significantly increased ( $p<0.005$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.02$ ) although the body weights of animals in the group of benomyl weren't any significant change.

Spleen weight was determined to be decreased in benomyl group ( $p<0.001$ ), there was no difference in another groups when compared with control group, was observed a significant decrease in weight of testes in benomyl group when compared with control group ( $p<0.001$ ), and a significant increase in another assay groups when compared with benomyl group ( $p<0.01$ ). No change in liver, kidney and heart weight was observed among groups.

Aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and lactate dehydrogenase activities were found to be significantly increased in benomyl group when compared with control group ( $p<0.005$ ). These enzyme activities were observed to significantly decrease in benomyl+ $\alpha$ -lipoic acid, benomyl+ chondroitin-4-sulphate and benomyl+ $\alpha$ -lipoic acid+ chondroitin-4-sulphate groups when compared with benomyl group ( $p<0.005$ ). It was observed there were almost no differences between the gammaglutamyl transferase levels of all groups.

Liver, kidney and serum malondialdehyde levels were observed to increase significantly in benomyl group when compared with control group ( $p<0.032$ ,  $p<0.001$ ).

Kidney and serum malondialdehyde levels in benomyl+ $\alpha$ -lipoic acid, benomyl+chondroitin-4-sulphate and benomyl+ $\alpha$ -lipoic acid+ chondroitin-4-sulphate groups were determined to decrease significantly when compared with benomyl group. However serum malondialdehyde levels in benomyl+ $\alpha$ -lipoic acid+ chondroitin-4-sulphate group was observed to decrease significantly when compared with control group ( $p<0.001$ ,  $p<0.01$ ).

Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and catalase activities in both liver and kidney were determined to decrease significantly in benomyl group when compared with control group, there were observed to increase significantly in benomyl+ $\alpha$ -lipoic acid, benomyl+ chondroitin-4-sulphate and benomyl+ $\alpha$ -lipoic acid+ chondroitin-4-sulphate groups when compared with benomyl group ( $p<0.05$ ). Liver and kidney superoxide dismutase, liver and kidney catalase liver and catalase kidney enzyme activities in animal of benomyl+ $\alpha$ -lipoic acid+ chondroitin-4-sulphate group were determined to increase significantly when compared with control group ( $p<0.05$ ).

Although various histopathological results were observed in the liver and kidney tissues in rats of benomyl group, histopathological effect on the liver and kidney tissues of rats in the groups of benomyl+ $\alpha$ -lipoic acid, benomyl+ chondroitin-4-sulphate and benomyl+ $\alpha$ -lipoic acid+ chondroitin-4-sulphate group wasn't observed.

**Key words;** Benomyl,  $\alpha$ -lipoic acid, chondroitin-4-sulphate, antioxidant

**TEŞEKKÜR**

Tezimin planlanması ve yürütülmesinde, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren değerli hocam sayın Prof. Dr. Tülin Aktaş'a, deneysel çalışmalarım sırasında gerekli imkânların hazırlanmasında ve kullanılmasında gösterilen anlayış ve bilimsel destekten dolayı Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na, çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen sayın hocalarım Doç. Dr. Figen Ertan, Yrd. Doç. Dr. Ayşegül Çerkezkayabekir ve Araş. Gör. Dr. Elvan Bakar'a, katkılarından dolayı T.Ü. Deney Hayvanları Biriminde görev yapan Vet. Hek. Ziya Çukur'a, Dr. Erdoğan Bulut'a ve her zaman destekleri ile yanımda olan sevgili eşim Yrd. Doç. Dr. Bilal Balkan, canım anneme ve canım oğluma teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET.....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>III</b>
<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>V</b>
<b>İÇİNDEKİLER.....</b>	<b>VI</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ÇİZELGELER LİSTESİ.....</b>	<b>X</b>
<b>KISALTMALAR.....</b>	<b>XI</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>4</b>
2.1. Karaciğer.....	4
2.2. Böbrek.....	9
2.3. Pestisitler.....	13
2.3.1. Pestisit sınıflandırılması.....	13
2.3.2. Pestisit metabolizması.....	15
2.3.3. N-metil karbamatlar.....	16
2.3.4. Benomil.....	16
2.4. Klinik enzimler.....	17
2.4.1. Aspartat aminotransferaz.....	18
2.4.2. Alanin aminotransferaz.....	18
2.4.3. Laktat dehidrogenaz.....	19
2.4.4. Gamma-glutamil tranferaz.....	20
2.5. Oksidatif stres.....	20
2.5.1. Oksidatif strese karşı vücut savunması ve antioksidanlar.....	22
2.5.2. Süperoksit dismutaz.....	25
2.5.3. Katalaz ve glutatyon peroksidaz.....	25
2.5.4. Glutatyon redüktaz.....	26
2.6. $\alpha$ -Lipoik asit.....	26
2.6.1. Alfa lipoik asidin moleküler yapısı ve fonksiyonları.....	27
2.6.1.1. Yapı ve temel biyokimyasal özellikler.....	27

2.6.1.2. LA'in metabolizması.....	28
2.6.2. LA'in fonksiyonları.....	28
2.6.2.1. LA'in diğer antioksidanlar üzerine etkisi.....	28
2.6.2.2. LA'in çeşitli hastalıklarda koruyucu etkisi.....	29
2.6.2.3. LA'in protein glikozilasyonunu engelleyici etkisi.....	29
2.6.2.4. LA'in ağır metallere karşı koruyucu etkisi.....	30
2.7. Glikozaminoglikanlar (GAG).....	30
2.7.1. Kondroitin-4-sülfat.....	30
<b>3. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>33</b>
3.1. Hepatik Hücre Hasarının Belirlenmesi.....	34
3.2. Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi.....	35
3.3. Antioksidan Savunmanın Belirlenmesi.....	37
3.3.1. SOD enzim aktivitesinin ölçülmesi.....	37
3.3.2. GPx enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	39
3.3.3 GR enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	41
3.3.4. CAT enzim aktivitesinin ölçülmesi.....	42
3.4. Total Protein Değerlerinin Belirlenmesi.....	43
3.5. Histolojik İnceleme.....	44
3.6. İstatistiksel Analizler.....	45
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>46</b>
4.1. Vücut Ağırlıkları.....	46
4.2. Organ Ağırlıkları.....	48
4.3. Hepatik Hücre Hasarının Belirlenmesi.....	49
4.4. Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi.....	51
4.5. Antioksidan Savunmanın Belirlenmesi.....	52
4.6. Total Protein Değerleri.....	54
4.7. Histolojik Bulgular.....	55
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>65</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>76</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>85</b>



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.1: Karaciğerin genel yapısı ve kan donanımı.....	5
Şekil 2.1.2: Karaciğerin lobüler yapısı.....	5
Şekil 2.1.3: Karaciğer hücresinin elektron mikroskopik yapısı.....	6
Şekil 2.1.4: Hepatik asinus ve zonlar.....	8
Şekil 2.2.1: Böbreğe kan sağlayan ana damarlar (a) ve nefronun mikrodolaşımı (b).....	10
Şekil 2.2.2: Nefronların genel yapısı (a) ve Juktaglomerular aparey (b).....	11
Şekil 2.3.4: Benomil'in kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.6.1.1: $\alpha$ -Lipoik asidin kimyasal yapısı.....	27
Şekil 2.7.1: Kondroitin-4-sülfatın kimyasal yapısı.....	31
Şekil 4.1: Sıçanların deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları.....	47
Şekil 4.2: Organ ağırlıklarındaki değişiklikler.....	49
Şekil 4.3: Hepatik hücre hasarına bağlı enzim değişiklikleri ve LA ile C4S'in etkileri.....	50
Şekil 4.4: Karaciğer, böbrek ve serum MDA değişiklikleri ve LA ile C4S'in etkileri.....	52
Şekil 4.5: Karaciğer ve böbrek dokularında antioksidan enzim (SOD, GPx, GR) aktiviteleri ile, LA ve C4S'in antioksidatif etkileri.....	53
Şekil 4.6: Karaciğer ve böbrek dokularında antioksidan enzim (CAT) aktiviteleri ile, LA ve C4S'in antioksidatif etkileri.....	54
Şekil 4.7.1: Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu.....	55
Şekil 4.7.2: Benomil grubuna ait karaciğer dokusu.....	56
Şekil 4.7.3: Benomil grubuna ait karaciğer dokusu.....	56
Şekil 4.7.4: Benomil+LA grubuna ait karaciğer dokusu.....	57
Şekil 4.7.5: Benomil+LA grubuna ait karaciğer dokusu.....	57
Şekil 4.7.6: Benomil+C4S grubuna ait karaciğer dokusu.....	58
Şekil 4.7.7: Benomil+C4S grubuna ait karaciğer dokusu.....	58
Şekil 4.7.8: Benomil+LA+C4S grubuna ait karaciğer dokusu.....	59
Şekil 4.7.9: Benomil+LA+C4S grubuna ait karaciğer dokusu.....	59
Şekil 4.7.10: Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu.....	60

Şekil 4.7.11: Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu.....	61
Şekil 4.7.12: Benomil grubuna ait karaciğer dokusu.....	61
Şekil 4.7.13: Benomil grubuna ait karaciğer dokusu.....	62
Şekil 4.7.14: Benomil+LA grubuna ait karaciğer dokusu.....	62
Şekil 4.7.15: Benomil+C4S grubuna ait karaciğer dokusu.....	63
Şekil 4.7.14: Benomil+LA+C4S grubuna ait karaciğer dokusu.....	63

## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.3.1: Pestisitlerin organlar ve sistemler üzerindeki kronik etkileri.....	15
Çizelge 2.4.1: AST'nin anormal kan düzeylerine ait klinik bozukluklar.....	18
Çizelge 2.4.2: ALT'nin anormal kan düzeylerine ait klinik bozukluklar.....	19
Çizelge 2.4.3: LDH'nin anormal kan düzeylerine ait klinik bozukluklar.....	20
Çizelge 4.1: Kontrol ve deney gruplarına ait hayvan sayıları.....	46
Çizelge 4.2: Benomil, lipoik asit ve kondroitin 4-sülfatın sıçanlarda vücut ağırlığı üzerine etkileri.....	47
Çizelge 4.3: : Benomil, lipoik asit ve kondroitin 4-sülfatın sıçanların organ ağırlıkları üzerine etkileri.....	48
Çizelge 4.4: Benomile bağlı hepatik hücre hasarında hepatik enzimlerdeki değişiklikler ve LA ve C4S'in enzim değerleri üzerindeki etkileri.....	50
Çizelge 4.5: Karaciğer, böbrek ve serum MDA değişiklikleri ile, LA ve C4S'in MDA değerleri üzerine etkileri.....	51
Çizelge 4.6: Karaciğer ve böbrek dokularında antioksidan enzim aktiviteleri ile, LA ve C4S'in antioksidatif etkileri.....	53
Çizelge 4.7: Karaciğer ve böbrek dokularında total protein miktarları ile LA ve C4S'in etkileri.....	54
Çizelge 4.8: Karaciğer ve böbrek dokularında Benomile bağlı histolojik değişiklikler ile LA ve C4S'in etkileri.....	64

## KISALTMALAR

ALT:	Alanin aminotransferaz
ALP:	Alkalen fosfotaz
APAP:	Asetominofen
As:	Arsenit
AST:	Aspartat aminotransferaz
B:	Benomil
BSA:	Sığır Serum Albumin
CAT:	Katalaz
CK-MB:	Kreatin fosfokinaz izozimi
CCl <sub>4</sub> :	Karbon tetraklorür
CS:	Kondroitin sülfat
C4S:	Kondroitin-4-sülfat
C6S:	Kondroitin-6-sülfat
CsA:	Siklosporin-A
DDT:	2,2-bis(p-klorofenil)-1,1,1-trikloroetan
DHLA:	Dihidroksilipoik asit
DMSA:	2,3-dimerkaptosüksinik asit
DS:	Dermatan sülfat
E <sub>2</sub> :	Dihidrolipoil transasetilaz
E <sub>3</sub> :	Dihidrolipoil dehidrogenaz
GAG:	Glikozaminoglikan
GGT:	Gamma-glutamil transferaz
GPx:	Glutasyon peroksidaz
GR:	Glutasyon redüktaz
GSH:	Glutasyon
GSSG:	Okside glutasyon
Gy:	X-ışınları
HYA:	Hiyalüronik asit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Hidrojen peroksit
5HBC:	5-hidroksi-2-benzimidazol karbamat

H: Hesperidin

INT: 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol-5-feniltetrozolum klorür)

IP: Intraperitoneal enjeksiyon

JG: Juktaglomerular

K: Kontrol

LDH: Laktat dehidrogenaz

LA:  $\alpha$ -Lipoik asit

LPO: Lipid peroksidasyon

MA: Moleküler ağırlık

MBC: Metil-2-benzimidazol karbamat

MDA: Malondialdehid

MV: Merkezi ven

NO: Nitrik oksit

$O_2^{\cdot-}$ : Süperoksid radikali

$\cdot OH$ : Hidroksil radikali

$^1O_2$ : Reaktif oksijen

SDS: Sodyum dodesilsülfat

SOD: Süperoksit dismutaz

TBA: Tiyobarbitürik asit

TCA: Trikarboksilik asit

XOD: Ksantin oksidaz

dk: Dakika

gr: Gram

kg: Kilogram

M: Molar

mmHg: Milimetre civa

ml: Mililitre

mg: Miligram

nmol: Nanomol

nm: Nanometre

$^{\circ}C$ : Santigrad derece

U: Ünite

v.a: Vücut ağırlığı

$\mu$ : Mikro

$\mu$ l: Mikrolitre

$\mu$ m: Mikrometre

$\kappa$ : Hız sabiti

## 1. GİRİŞ

Dünyada kontrolsüz ve çok hızlı bir şekilde artan nüfusa karşılık her geçen gün tarım alanlarımız amaç dışı kullanımla (otayol, fabrika vb.) azaltılmaktadır. Tarım alanlarındaki bu azalış, artan nüfusa ürün sağlanmasında ve gıda ihtiyacının karşılanmasında yetersizliğe neden olmaktadır. Bu sorunun giderilebilmesi için kaliteli ve verimi yüksek ürün elde etmenin yolları aranmaktadır. Bu nedenle ürün miktarını ve kalitesini düşürebilecek olan mikroorganizma, böcek ve yabancı otlarla mücadelede etkili kimyasal maddeler kullanılmaktadır.

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de pestisit adı verilen bu tür kimyasal maddeler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak pestisitler suda, toprakta ve besinler üzerinde uzun süre bozulmadan kalarak, hem çevre kirliliğine neden olmakta hem de besin zinciri yoluyla insana kadar ulaşabilmektedir. Çeşitli yollarla organizmaya giren bu kimyasal maddeler pek çok sağlık sorununa, özellikle karaciğer ve böbrek dokularında farklı mekanizmalarla önemli bozukluklara neden olabilmektedir. Son yıllarda da bu kimyasalların neden olduğu hasarların belirlenmesi ile ilgili pek çok araştırma yapılmıştır (Campo vd. 2004, Balkan ve Aktaş 2005, Gedik vd. 2005, Rajeswary vd. 2007).

Pestisitler etki ettikleri organizma çeşidine göre sınıflandırılabilirler: insektisitler (böcekler üzerine etkili), herbisitler (zararlı otlar üzerine etkili), akarazitler (akarlar üzerine etkili) ve fungusitler (mantarlar üzerine etkili) gibi. Benomil, geniş spektrumlu karbamatlı bir fungusittir. Benomil toksisitesi üzerine pek çok araştırma bulunmaktadır. Bu araştırmalar genellikle benomil'in sitogenetik (Barale vd. 1992, Dolara vd. 1994, Dane ve Dalgıç 2005), teratojenik (Cummings vd. 1990), karsinojenik (Shukla 1989) etkileri ile erkek üreme sistemleri (Carter vd. 1984, Lim ve Miller 1996, Sorour ve Larink 2000) üzerine yapılmıştır. Benomil spontan olarak aktif olan karbendazime yani MBC'ye (Metil-2-benzimidazol karbamat) dönüşebilir. Her iki bileşikde birçok organizmada gen mutasyonu ve anojenik etkilere neden olabilir (Barale vd.1992, Dolara vd. 1994). Benomil'in memelilerde, bitkilerde ve funguslarda temel etkisinin tubuline

bağlanarak, onun polimerisasyonunu ve mikrotübül oluşumunu inhibe etmek olduğu belirtilmiştir (Carter vd.1984).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada benomil'in iki farklı dozunun (1000 ppm ve 4000 ppm) karaciğer gamma glutamil transferaz (GGT) düzeylerini arttırdığı belirtilmiştir (Shukla vd., 1989). Sıçanlarla yapılan bir diğer çalışmada ise benomil'in 16 farklı dozu hayvanlara uygulanmış ve uygulama sonucunda böbrek, karaciğer ve dalak dokuları üzerinde benomil'in bazı dozlarının toksik bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Igbedioh ve Akinyele, 1992). Yüksek dozlarda uygulanan benomil metaboliti karbendazim'in böbrek dokusunda fibrozis, tubuler dejenerasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu meydana getirdiği belirlenmiştir (Selmanoğlu vd. 2001). Yine karbendazimle yapılan bir diğer çalışmada ise sıçanların tiroid, paratiroid ve adrenal bezlerinde toksik etkilere rastlanmıştır (Barlas vd. 2002).

Son yıllarda pestisitlerin neden olduğu hasarların belirlenmesinin yanı sıra bu hasarların önlenmesi ve tamir edilmesi ile ilgili araştırmalar da çok büyük önem kazanmıştır. Yapılan çalışmalarda, özellikle karaciğer dokusunda belirlenen hasarların çoğunun oksidatif stres yoluyla meydana geldiği belirtilmiştir (Hoek ve Pastorino 2002, Kaplowitz 2002).

Oksidatif stres, reaktif oksijen ürünleri oluşumu ve antioksidatif savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. Reaktif oksijen ürünleri olan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikali ( $OH$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ) ve nitrik oksit (NO) in vivo koşullarda sürekli oluşmaktadır. Reaktif oksijen ürünlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri ya da kısaca antioksidanlar olarak bilinirler. Oksidanların arttığı veya antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda organizmanın maruz kaldığı oksidatif stres sonucunda bozulan hücresel metabolizma, moleküler yıkılma ve doku hasarı meydana getirir (Karaca 2009). Antioksidanlar, endojen (doğal) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki gruba ayrılabilirler.  $\alpha$ -Lipoik asit (LA) ve kondroitin 4-sülfat (C4S) endojen kaynaklı antioksidanlar grubunda yer almaktadırlar.



LA, besinlerden hızlı bir şekilde absorbe edilebilir olması, diğer antioksidanları yenileyebilir olması, C vitamininin oksitlenmiş formu dehidroaskorbik asitten C vitaminini yeniden meydana getirebilmesi, hücrelerimizde bulunan ve çok önemli olan glutatyonun düzeyini artırabilmesi ve çeşitli hastalıklarda tedavi edici olarak kullanılıyor olması ile ideal bir antioksidan olarak nitelendirilmektedir (Akpınar vd., 2007). Çeşitli organizmalarda farklı yollarla oluşturulan oksidatif stres modelleri üzerinde LA ve kondroitin sülfatın (CS) koruyucu etkilerinin araştırıldığı bazı çalışmalar vardır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, cisplatin ile kohleada meydana getirilen ototoksisitenin  $\alpha$ -lipoik asit tarafından önemli ölçüde geriletildiği gösterilmiştir (Rybak vd., 1999). Bir başka çalışmada ise, sıçanlara CCl<sub>4</sub> ile oluşturulan hepatoksisite modelinde, intraperitoneal olarak uygulanan kondroitin sülfatın antioksidatif etkisi rapor edilmiştir (Ha ve Lee, 2003). Pires Das Neves ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada farelerde oluşturdukları sodyum arsenit toksisitesine karşı  $\alpha$ -lipoik asitin koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (Pires Das Neves vd., 2004). Farelerde yapılan bir başka çalışmada,  $\alpha$ -lipoik asitin X-ışınlarının neden olduğu oksidatif stresi geriletmediği belirtilmiştir (Manda vd., 2007). Bir diğer çalışmada, asetaminofene bağlı olarak oluşan hepatik ve renal hasarlarda  $\alpha$ -lipoik asitin koruyucu etkisi gösterilmiştir (Abdel-Zahaer vd., 2008).

Bu konuda yapılan çalışmalarda, koruyucu etkiler genellikle akut dönemlerde incelenmiştir. Bu çalışmada ise, benomil ile oluşturulan subkronik toksisite modelinde, kondroitin 4-sülfat ve  $\alpha$ -lipoik asit'in tek tek ve birlikte uygulanmalarının karaciğer ve böbrek dokuları üzerinde oluşturabileceği antioksidatif etkilerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

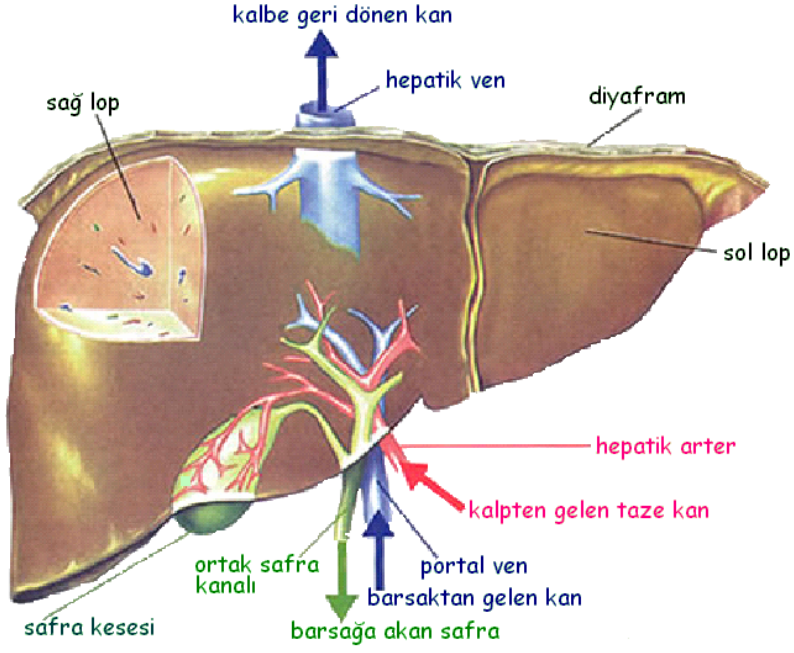
### 2.1. Karaciğer

Karaciğer organizmanın en büyük bezi ve organıdır. Ağırlığı yaklaşık olarak 1,5 kg'dır. Diyaframın hemen altında, karın boşluğunun sağ üst kısmına yerleşmiştir. Karaciğer safra kanalları yoluyla salgısını duodenuma boşalttığından ekzokrin, sentezlediği maddeleri kana doğrudan doğruya verdiği için endokrin bir bez olarak nitelendirilir.

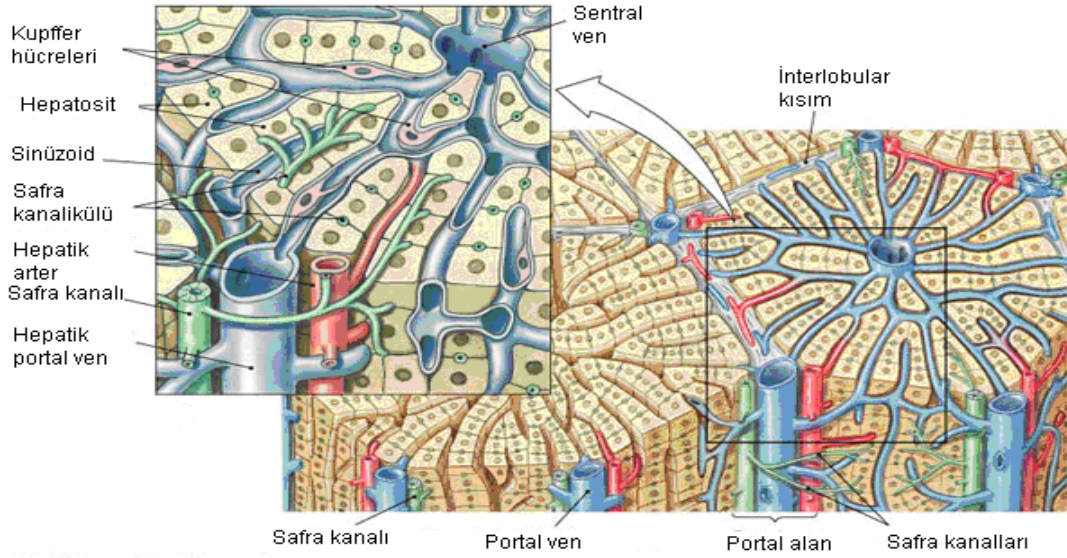
Karaciğer, hilumda kalınlaşan ince bir bağ dokusu kapsülü (Glisson kapsülü) ile örtülüdür. Hilumda, organa portal ven ve hepatik arter girer, sağ ve sol hepatik safra kanalları çıkar. Bu damarlar ve kanallar, klasik karaciğer lobülleri arasındaki portal alanlarda bağ dokusu ile çevrilmişlerdir. Bu alandan başlayarak ince bir retiküler lif ağı hepatositlere ve karaciğer lobüllerinin sinüzoidal endotel hücrelerine destek sağlar.

Karaciğer çok zengin bir kan donanımına sahiptir; oksijenlenmiş kan sağ ve sol hepatik arterler (%25) yoluyla, besince zengin kan portal ven (%75) yoluyla karaciğere gelir. Bu damarların her ikisi de karaciğere, porta hepatitten girer. Kan organın posteriyor kısmından hepatik venler aracılığıyla ayrılır ve hepatik venler içeriklerini inferiyor vena kavaya bırakırlar. Safra, hepatik kanallar yoluyla, porta hepatitten ayrılarak yoğunlaştırılır ve saklanmak üzere safra kesesine verilir, ya da ortak safra kanalı ile barsağa akıtılır (Şekil 2.1.1).

Karaciğer parankimasının %60'ını oluşturan hepatosit hücreleridir ve bu hücreler asıl karaciğer hücreleri olarak nitelendirilirler. Bu epitelyal hücreler birbirleri ile bağlantılı plaklar halinde gruplaşarak klasik karaciğer lobülünü oluştururlar (Şekil 2.1.2). Karaciğer lobülü 0,7×2 mm boyutlarında poligonal bir doku kitlesidir. Bazı bölgelerde, lobüller safra kanalları, lenfatik sinirler ve kan damarları içeren bağ dokusu ile sınırlanmıştır. Portal alanlar verilen bu bölgeler, lobüllerin köşelerinde bulunur ve portal triadlarla çevrilmiştir.

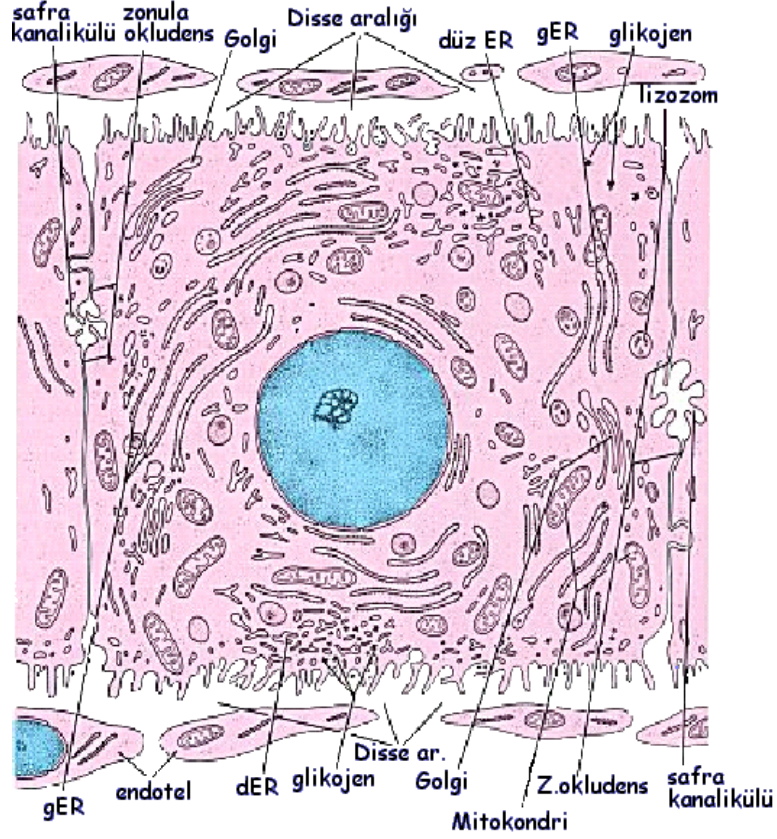


**Şekil 2.1.1:** Karaciğerin genel yapısı ve kan donanımı (<http://www.answer-my-health-question.info/images/how-to-detoxify-your-liver-1.jpg>).



**Şekil 2.1.2:** Karaciğerin lobüler yapısı ([http://www.harford.edu/faculty/WRappazzo/a\\_oldsite/liver%20histology.jpg](http://www.harford.edu/faculty/WRappazzo/a_oldsite/liver%20histology.jpg)).

Hepatositler, karaciğer lobülü içinde ışınsal olarak dizilmiştir. Hücreler 1 ya da 2 hücre kalınlığında tabakalar (plaklar) oluştururlar. Bu hücre plakları lobulün periferinden merkeze yönelmişlerdir, bir labirent ve süngersi bir yapı oluşturacak şekilde anastomozlaşırlar. Bu plaklar arasındaki alanlar karaciğer sinusoidleri olarak adlandırılır (Şekil 2.1.2).



**Şekil 2.1.3:** Karaciğer hüresinin elektron mikroskopik yapısı (<http://www.med-ed.virginia.edu/courses/cell/handouts/images/Liver4.gif>).

Karaciğer hücreleri polihedral, 6 ya da daha fazla yüzeylidirler. Elektron mikroskopik kesitlerde, çok sayıda mitokondri ve düzgün yüzeyli endoplazmik retikulum gözlenmektedir (Şekil 2.1.3).

Hepatositlerin çoğu tek nukleus içerir. Nukleusların yaklaşık %50'si diploiddir. Hepatositler hem kendileri kullanmak, hem de dışarı vermek üzere aktif bir şekilde protein sentez ederler. Bu nedenle çok sayıda serbest ribozom, granüllü ER ve golgi

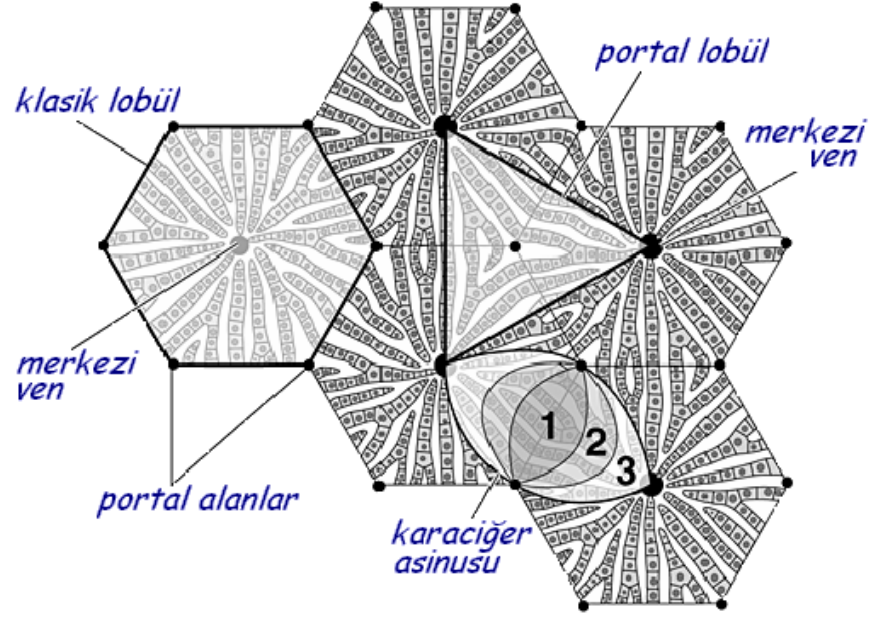
aygıtına sahiptirler. Golgi aygıtı hücrelerde kanaliküllerin yakınında periferde lokalize olmuşlardır. Hepatositler fazla enerjiye ihtiyaç duymaları sebebiyle, çok sayıda mitokondri içerirler. Karaciğer hücreleri, peroksizom ve lizozom bakımından da zengindirler. Hepatositlerin düz yüzlü ER'ları, kanda toksinler ve çeşitli ilaçların varlığında indüklenir. Çünkü detoksifikasyon bu organellerin keselerinde gerçekleşir. Hepatosit sitoplazması yağ damlacıkları ve glikojen şeklinde inklüzyonlar içerir. Glikojen ise çoğunlukla granülsüz ER yakınında gözlenen, 20–30 µm çapında, elektron yoğun birikimler şeklinde gözlenir ve bunlar β-partikülleri olarak ifade edilir.

Hepatositler tarafından yapılan safra salgısı, hepatositler arasındaki ince safra kanaliküllerine verilir. Bu safra kanalikülleri klasik lobülün periferindeki portal alanda bulunan lobüller arası safra kanalları ile birleşir. Lobüller arası safra kanalları giderek genişleyen kanallara değişir. Bu kanallarda sonunda, sağ ve sol hepatik safra kanalları ile birleşerek karaciğeri terk eder. Karaciğerde safra salgısı kan akımına ters yönde, klasik lobülün merkezinden, perifere doğru akar.

Sinüzoidleri astarlayan endotel hücreleri hepatositlerden Disse aralığı adı verilen perisinüzoidal alanla ayrılmıştır. Bu alanda retiküler lifler ve hepatosit mikrovillusları yer alır. Bu bölge sadece çok sayıda makromoleküllerin hepatositler tarafından kana verilmesi nedeniyle değil, aynı zamanda bu makromoleküllerin çoğunu alıp katabolize etmesi ile de fizyolojik bir öneme sahiptir. Sinüzoidlerin duvarında endotel hücrelerle birlikte yerleşmiş Kupffer hücreleri bulunur. Bu hücreler yüksek derecede fagositoz yeteneğine sahiptirler ve tipik makrofajlardır. Gerçek fonksiyonları yaşlı eritrositleri metabolize etmek, hemoglobini parçalamak ve immünolojik olaylarla ilgili proteinleri salgılamaktır.

Karaciğerin fonksiyonel birimlerinden biri de karaciğer parankimasının bir birimi olarak kabul edilen hepatik asinusdur (Şekil 2.1.4). Hepatik asinus, iki komşu lobül içinde aynı interlobüler venden kanlanan hücre grupları olarak tanımlanır. Lobüller arasında ilerleyen interlobüler ven komşu iki lobüle dağılmaktadır. Hepatik asinus da dağıtıcı venlere olan yakınlığına göre zonlara ayrılır. I. zondaki hücreler damarlara en yakın ve bu nedenle de gelen kandan ilk olarak etkilenen hücrelerdir. II.

zondaki hücreler kana ikinci derecede cevap veren hücrelerdir, III. zondaki hücreler ise, önceden I. ve II. zondaki hücreler tarafından değiştirilmiş olan portal ven kanıyla karşılaşacaktır. Bu zonal düzenleme, hepatositlerin çeşitli zararlı ajanlar ya da hastalıklarda, farklı derecelerde hasar görmelerinin nedenini açıklayabilir.



**Şekil 2.1.4:** Hepatik asinus ve zonlar. PA: portal alan, MV: merkezi ven (<http://www.drcemre.googlepages.com/k.catanomi3-full.jpg>).

Karaciğer, çok yönlü hücrelere sahiptir ve bu nedenle bu hücreler pek çok fonksiyonda rol oynarlar. Karaciğer hücreleri, kendisi için gerekli proteinlerin sentezine ek olarak, salgılamak için çeşitli plazma proteinlerini de (albumin, protrombin, fibrinojen ve lipoproteinler) sentezlerler. Bu proteinlerin sentezi granüllü ER'a bağlı ribozomlarda yapılır. Hepatositler proteinleri sekonder granüller halinde sitoplazmasında depolamazlar, sürekli olarak kan dolaşımına verirler. Böylece endokrin bir bez olarak da fonksiyon görür. Karaciğer tarafından dışarı verilen proteinlerin yaklaşık olarak % 5'i makrofaj sistemi hücreleri (kupffer hücreleri) tarafından geri kalanı da hepatositlerde sentez edilir.

Safra üretilmesi, hepatositlerin kan bileşenlerini alıp, dönüştürüp safra kanalikülleri içine salgılaması olayıdır. Safra, su ve elektrolitlere ek olarak birkaç esansiyel bileşene de sahiptir. Bunlar safra asitleri, fosfolipitler, kolesterol ve bilirubindir.

Lipitler ve karbonhidratlar trigliseritler ve glikojen şeklinde karaciğerde depolanır. Metabolitleri depolama kapasitesi, vücudun öğünler arasındaki enerji gereksinimini karşıladığı için önemlidir. Karaciğer vitaminler (özellikle A vitamini) için de büyük bir depo görevi görür.

Hepatosit, lipitleri ve aminoasitleri glukoneogenesis adı verilen kompleks enzimatik bir olayla glikoz haline dönüştürür. Ürenin meydana gelmesi ile sonuçlanan aminoasit deaminasyonunun da asıl yeridir (Karaciğere ait genel bilgiler: Leeson vd., 1988, Junqueira vd. 1995, Gartner ve Hiatt 1997).

## 2.2. Böbrek

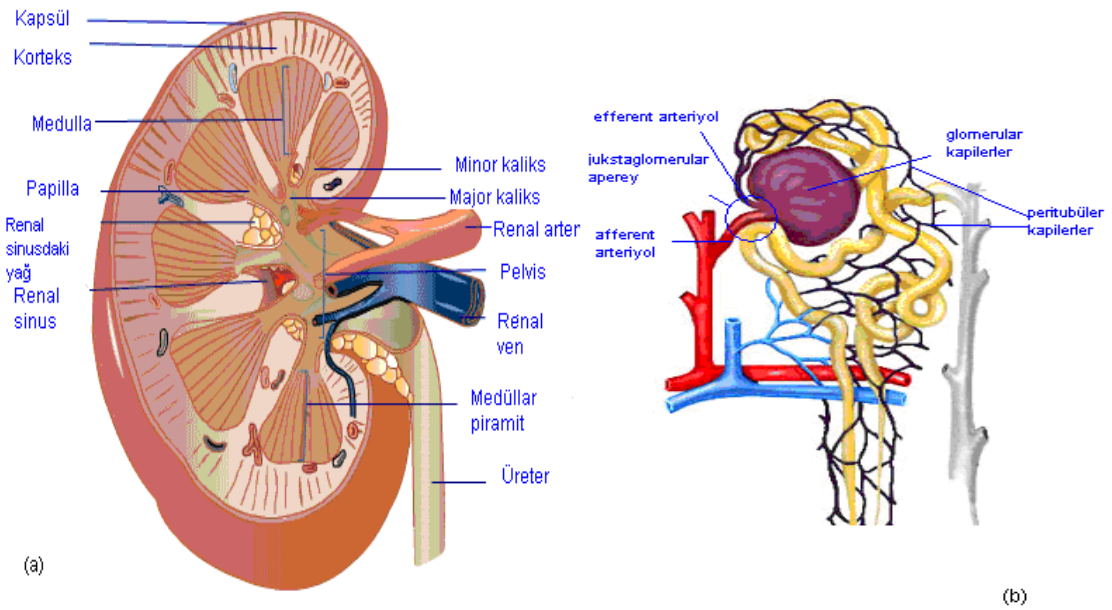
Böbrekler hayati öneme sahip olan boşaltım, homeostasi ve endokrin fonksiyonları yerine getiren organlardır. Böbrekler periton boşluğunun dışında ve karın arka duvarında yer alırlar. Yetişkin insanda her bir böbreğin ağırlığı 150 gramdır ve yaklaşık bir yumruk büyüklüğündedir.

Her böbreğin mediyal kısmında hilum denen, böbrek arter ve ven lenfatiklerinin, sinirlerin ve nihai idrarın böbrekten boşaltılınca kadar beklediği yer olan mesaneye taşıyan üreterlerin girip çıktığı çukur bir bölge bulunur. Eğer böbrekler en üst noktası ile alt ucu arasındaki uzun ekseninden ikiye kesilecek olursa dış kısımda korteks, iç kısımda medulla denen iki ana bölge ayırılır. Böbreğin medullasında böbrek piramitleri denen koni biçimli çok sayıda doku kitleleri bulunur. Piramitlerin tabanı korteksle medulla arasındaki sınırdan başlar ve üreterin huni biçimli üst ucunun devamında oluşan böbrek pelvisine doğru uzanan papillada son bulur. Pelvisin dış sınırı major kaliks denen açık ceplerde aşağı doğru uzanır ve her papillada tübüllerden idrar toplayan



minor kalikslere ayrılır. Kalikslerin, pelvisin ve üreterlerin duvarları, idrarı boşaltıncaya kadar sakladığı mesaneye doğru ilerletebilen kasılabilir elemanları içerir.

Böbreğin kan akımı normalde kan debisinin %22' sidir ve dakikada 1100 ml'dir. Böbrek arteri, hilum bölgesinden böbreğe girer ve interlober, arkuat, interlobüler arterlere ve afferent arteriyollere ayrılır (Şekil 2.2.1a). Afferent arteriyoller, plazma proteinleri dışında, çok miktarda su ve maddenin filtre edilerek idrar yapımının başladığı glomerüllerdeki glomerüler kapillerleri oluşturur (Şekil 2.2.1b). Her glomerüler kapillerin distal ucu, böbrek tübüllerini çevreleyen ve peritübüler kapiller denilen ikinci bir kapiller ağı oluşturan efferent arteriyolu oluşturmak için bir araya gelirler.



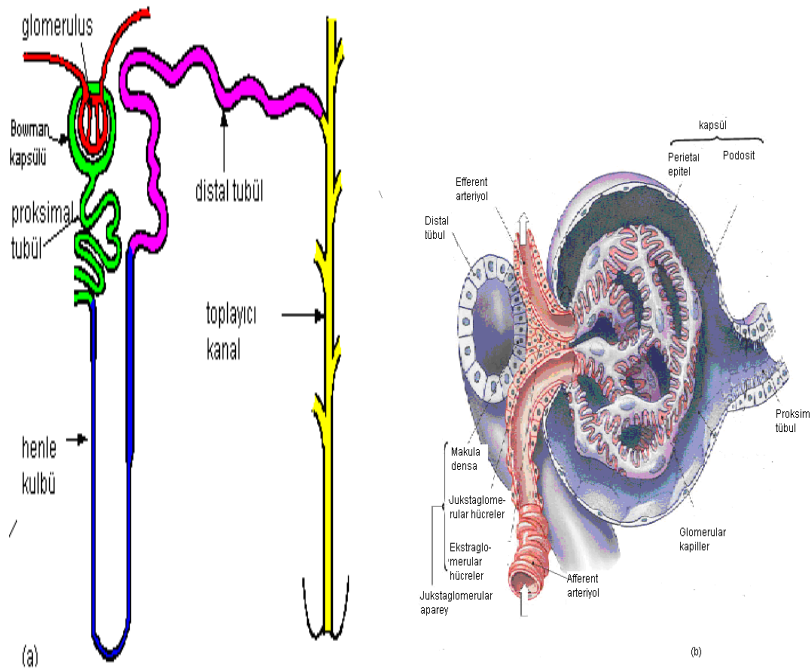
**Şekil 2.2.1:** Böbreğe kan sağlayan ana damarlar (a) (<http://www.haberlersaglikli.com/haberimg/BOBREK.gif>) ve nefronun mikrodolaşımı (b) (<http://www.bioengineering.canterbury.ac.nz/groups/kidney.htm>).

Böbrek kan dolaşımı, iki ayrı kapiller yatağı olan özel bir dolaşımdır. Glomerüler ve tübül çevresi kapiller seri şeklinde düzenlenmişlerdir ve birbirlerinden her iki kapiller yatakta da hidrostatik basıncın düzenlenmesine yardımcı olan efferent arteriyol ile ayrılırlar. Glomerüler kapillerlerdeki yüksek hidrostatik basınç (takriben 60



mmHg) sıvının çabuk filtrasyonuna neden olur, oysa peritübüler kapillerde çok daha düşük olan (13 mmHg civarında) hidrostatik basınç sıvının çabuk geri emilimine olanak sağlar. Böbrekler afferent ve efferent arteriyollerin direncini ayarlayarak, hem glomerüler, hem peritübüler kapillerde hidrostatik basıncı düzenler, böylece vücudun homeostatik ihtiyaçlarına cevap verirler. Böbreklerin fonksiyonel birimi nefronlardır. Böbrekler nefronları yenileyemezler. Bu nedenle, böbrek hasarı, hastalık veya normal yaşlanmada böbreklerdeki nefron sayısı giderek azalır. 40 yaşından sonra işlev gören nefron sayısı her 10 yıl için % 10 azalır. Her nefronun iki ana bölümü vardır: 1. kandan büyük miktarda sıvının filtre olduğu glomerül (glomerulus) ve 2. böbrek dokusu içindeki yolu boyunca, filtre edilen sıvının idrara dönüştüğü tübül.

Glomerulus, diğer kapiller ağlar ile karşılaştırıldığında, daha yüksek hidrostatik basınca sahip, dallanan ve anastomoz yapan kapiller bir ağdan oluşmuştur. Glomerüler kapiller, epitel hücreler ile örtülmüş ve tüm glomerül Bowman kapsülü ile sarılmıştır (Şekil 2.2.2a).



**Şekil 2.2.2:** Nefronların genel yapısı (a) ve Jukstaglomerular aparey (b) (<http://www.ahobart.btinternet.co.uk/biology/images/nephron.gif>), ([http://www.iupucanatomy.com/chapter\\_26.htm](http://www.iupucanatomy.com/chapter_26.htm)).

Glomerulusta filtre olan sıvı, Bowman kapsülü içine ve sonra böbrek korteksinde yer alan proksimal tübül içine akar. Proksimal tübülden sonra böbrek medullasının derinliklerine doğru inen (descending) ve çıkan (ascending) kol gelir. İnen kolun ve çıkan kolun alt ucunun duvarları çok incedir ve bu nedenle Henle kıvrımının ince kısmı olarak isimlendirilir (Şekil 2.2.2a). Henle kıvrımının inen kolu, kortekse doğru dönüş yaptıktan sonra, tübüler sistemin diğer kısımlarında olduğu gibi kalınlaşır ve bundan dolayı, çıkan kolun kalın segmenti olarak adlandırılır.

Çıkan kolun sonunda, duvarında bir plak içeren kısa bölüme makula densa denir. Makula densa, afferent arteriyolün jukstaglomerular hücreleri ile birlikte jukstaglomerular apareyi oluşturur (Şekil 2.2.2b). JG aparey, nefron fonksiyonunun kontrolünde önemli rol oynar. Makula densadan sonra proksimal tübül gibi böbreğin korteksinde yerleşmiş olan distal tübüle ulaşılır. Distal tübülü, birleştirici tübül ve kortikal toplayıcı tübül izler. Sıvı buradan kortikal toplayıcı kanala ulaşır (Şekil 2.2.2a). 8–10 adet kortikal kanalın başlangıç kısımları birleşerek medullada seyreden ve medullar toplayıcı kanal denen daha geniş bir toplayıcı kanal yaparlar. Toplayıcı kanallar giderek daha da genişleyen kanalları oluştururlar ve sonunda papillanın tepesi aracılığıyla böbrek pelvisine boşalırlar. Her böbrekte her biri 4000 nefrondan idrar toplayan 250 kadar çok geniş toplayıcı kanal vardır.

Böbrekler pek çok görevi üstlenmiş organlardır:

1. Yabancı maddelerin ve metabolik artıkların atılması,
2. Su ve elektrolit dengesinin düzenlenmesi,
3. Vücut sıvılarının osmolaritesinin ve elektrolit yoğunluğunun düzenlenmesi,
4. Asit-baz dengesinin düzenlenmesi,
5. Arteryal kan basıncının düzenlenmesi,
6. Hormonların salgılanması, metabolize edilmesi ve boşaltılması.

(Böbreğe ait genel bilgiler: Guyton ve Hall, 2001).

### 2.3. Pestisitler

Tarımsal ürünlere, zarar veren ya da hastalık yapan canlılara karşı kullanılan kimyasallara pestisit adı verilir. Pestisitler amaçları dışındaki canlıları da etkilemeleri nedeniyle biyosid (canlı yok edici) olarak da isimlendirilirler. Pestisitler çevremizde amaçsız, sınırsız ve kontrolsüz olarak kullanılmaktadır. Bu kimyasal maddeler, havada, suda, toprakta, yağmurda, karda, buzda bulunabilmektedir.

Pestisitler sorun yaratan böcekler, hayvanlar, mikroorganizmalar, yabani otlar ve diğer zararlıların ölmesini ya da davranışlarını değiştirmesini sağlayan biyolojik olarak aktif kimyasallardır. Pestisitler biyolojik birikimle canlıların vücutlarında yoğunlaşabilir. Bu zincirde hareket ederken her aşamada daha büyük bir orana ulaşmaktadır.

Bugün kullanılan pestisitlerden bazılarının kullanımı yüzyıllar öncesine dayanmaktadır. M.Ö. 1000 yıllarında Homer kükürt fumigasyonundan söz edilmektedir. Democroticus bitki küfünün önlenmesi için yapraklarını zeytin ekstreleri ile yağlamıştır. M.Ö. 200 yıllarında Cato üzüm bağlarında kükürt dumanını kullanmıştır. Bu nedenle pestisit olarak kullanılan ilk maddelerden biri kükürt olmuştur. DDT [2,2-bis(p-klorofenil)-1,1,1-trikloroetan] Amerika'da 1943'de ilk kez pestisit olarak insanlığın hizmetine girmiştir (Güler ve Çobanoğlu 1997).

#### 2.3.1. Pestisitlerin sınıflandırılması:

Pestisitlerin sınıflandırılması pek çok şekillerde yapılmaktadır.

##### 1- Hedef alınan organizmaya göre;

- **Akarasitler:** Akar öldürücüler
- **İnsektisitler:** Böcek öldürücüler
- **Herbisitler:** Ot öldürücüler

- **Fungusitler:** Mantar öldürücüler
- **Nematositler:** Nematod öldürücüler
- **Avisitler:** Kuş öldürücüler
- **Pisisitler:** Balık öldürücüler

## 2- Kimyasal tiplerine göre;

- N-metil karbamatlılar
- Klorlu hidrokarbonlar
- Organotinler
- Botanik kökenli maddeler
- Fosfatlı hidrokarbonlar
- Bistitiyo karbamatlar
- Arsenik
- Fenoksialifatik asitler
- Fenol türevleri
- Mikrobiyoller

## 3- Kullanım tekniklerine göre;

- Püskürtme
- Sürme
- Gazlama
- Enjeksiyon

## 4- Kalıcılıklarına göre;

- Kalıcı olamayanlar: Birkaç günden–12 haftaya kadar etkisini sürdürenler
- Orta derecede kalıcı olanlar: 1–18 ay arasında dayanabilenler
- Kalıcı olanlar: Birçok klorlu hidrokarbon bu gruba girmektedir. 20 yıl kadar dayanabilmektedir.
- Sürekli kalıcı olanlar: Civa, kurşun, arsenik.

## 5- Formülasyon şekline göre;

- Toz
- Sıvı
- Gaz
- Granül

### 2.3.2. Pestisit metabolizması

Pestisitler vücutta bazı enzimatik olaylara katılmaktadır. Enzimatik olaylar, kimyasal değişimin türüne göre 4 grupta toplanır; oksidasyon, redüksiyon, kopma ve konjugasyon. Bunlardan ilk üçü Faz I aşaması iken, konjugasyon Faz II aşamasıdır. Pestisitler, Faz I aşamasında karaciğerde sitokrom P monooksijenazlar tarafından oksidasyona uğratarak, biyolojik yarı ömrü kısa olan polar bileşiklere dönüşmektedir. Faz II aşamasında ise değişime uğrayan pestisitler, sudaki polariteleri yüksek olan glukuronik asitle ya da glutatyon (GSH) ile konjuge edilmektedir. Pestisit biyofarmasyonu sonucunda pestisit metabolitleri doku makromoleküllerine (DNA, protein) kovalent bağlanarak biyolojik yarı ömürlerini artırırlar.

Bir takım canlı organizmaları hedef alarak geliştirilen tarımsal mücadele ilaçları insanları da etkisi altına almaktadır. İnsanlarda zehirlenmeler, ilaçların vücutta deri, solunum ve sindirim yoluyla girmesi sonucu meydana gelmektedir. Özellikle DDT, endrin, aldrin ve heptaklor gibi vücutta uzun süre kalıcılığı ve vücutta birikme özelliği olan organik klorlular düşük dozda da olsa kronik zehirlenmelere yol açmaktadır. Pestisitlerin kronik etkileri aşağıdaki tabloda yer almaktadır (Çizelge 2.3.1.) (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

**Çizelge 2.3.1.** Pestisitlerin organlar ve sistemler üzerindeki kronik etkileri (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

Organ/Sistem	Etki
Sinir sistemi	Polinöropati, distani, retinal anjiyopati
Solunum sistemi	Kronik trakeit, bronşiol astım
Kardiyovasküler sistem	Kronik miyokard toksisitesi, kronik koroner yetmezlik, hipertoni ve hipotoni
Karaciğer	Kronik hepatit, kolesistit
Böbrekler	Albuminüri, üre, kreatin artışı, salgı fonksiyonunda azalma
Gastrointestinal Sistem	Kronik gastrit, duodenit ülser, kronik kolit
Dolaşım sistemi	Lökopeni, lenfopeni, monositoz ve hemoglobinde değişimler
Deri	Egzama
Göz	Konjunktivit, blefarit

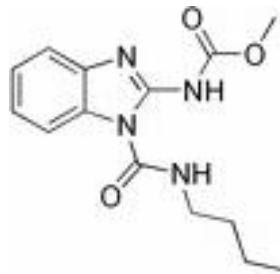
### 2.3.3. N-metil karbamatlar

Karbamatlar karbonik asitten türetilmektedir ve büyük çoğunluğu temas insektisitidir. Bunlar akut toksik etkileri bakımından organofosfatlılara benzemektedir. Etkileri büyük oranda kolinesteraz enziminin inhibisyonu ile ilişkilidir. Bu enzimin inhibisyonu kolayca tersinir durumdadır ve belirtiler erken dönemde ortaya çıkmaktadır.

N-metil karbamat pestisit etkileniminde kolinesteraz seviyesi tayinleri daha az fikir vericidir. Daha çok karbamilasyon meydana gelir ve kanın laboratuara taşınması sırasında kolayca reversibl olduğundan ortadan kalktığı için belirlenebilmesi güçtür. Antidodu atropindir. Toksik etkiye sahip ve yaygın olarak kullanılan karbamatlar; aldikarb, methomil, karbofuran, oksamil, metilizosiyanat, sevin, karbamil, dimetitan, propoksur ve landrin'dir (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

### 2.3.4. Benomil

Benomil (Şekil 2.3.4), benzimidazol ailesine ait koyu renkli ve berrak olan sistemik bir fungusittir. Benomil fungusit olarak ilk kez 1968'de isimlendirilmiş ve uluslararası DuPont şirketi tarafından 1971'de piyasaya sürülmüştür. Bu fungusit tarla ürünleri, meyveler, mantarlar ve çimlerdeki fungal hastalıkların önlenmesi için kullanılır. Aynı zamanda sığır ve koyunlarda bazı mantarların neden olduğu toksik hastalıklarla mücadelede de kullanılır (Terse vd. 1993).



**Şekil 2.3.4:** Benomil'in kimyasal yapısı (<http://www.answers.com/topic/benomyl>).

Benomil memelilerde hızlı bir şekilde absorbe edilir, karaciğerde 2 farklı yol ile (hidroksilasyon ve hidroliz) metabolize edilerek idrar ve dışkı ile vücuttan dışarı atılır. Benomil'in hayvanlarda tespit edilen metabolitleri; benzimidazol 2-karbamata (MBC, karbendazim) ve 5-hidroksi-2-benzimidzole karbamat'tır (5HBC). Bu metabolitlerin vücut dokularında depo edilmediği gözlenmiştir (Gardiner vd, 1974).

#### **Benomil'in kimliği:**

**Yaygın adı:** Benomil

**Ticari isimleri:** Benlate, Benason, Fundazol, Benex, Agrosit

**IUPAC kimyasal adı:** Metil 1-[(bütilamino) karbonil]-1H- benzimidazol-2-karbamat

**Moleküler formülü:**  $C_{14}H_{18}N_4O_3$

**Moleküler ağırlığı:** 290.3 g/mol

**Fiziksel durumu:** Renksiz kristalize

**Stabilite:** Sulu çözeltilerinde hızla hidrolize olurlar.

**Çözünürlüğü:** 20°C, pH 7 olan suda 3.8 mg/L

**Dansite:** 0.38 g/cm<sup>3</sup>

#### **2.4. Klinik Enzimler**

Klinik enzimolojinin gelişimi 20. yy başında sindirim enzimlerinin bulunması ile başlamıştır. 1954 yılında miyokard enfarktüsü sonrası serum aspartat (AST) düzeyinde geçici bir artış saplanmış ve plazma enzim aktivitelerinin hastalık tanısı ve takibindeki önemi ortaya çıkmıştır. Bu gelişmelerin ardından alkalen fosfatazın (ALP) kemik ve karaciğer hastalarında, asid fosfatazın prostat kanserinde, amilazın pankreatitte, AST ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeylerinin karaciğer ve kalp hastalarında tanısal yararının kanıtlanması ile klinik enzimoloji alanına duyulan ilgi artmaya başlamıştır.

Kalp, karaciğer, kas, hematolojik, kalıtsal hastalıklar başta olmak üzere enzimler tanıda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Onat vd. 1995, Adam ve Ardıçoğlu 2002).

### 2.4.1. Aspartat aminotransferaz

Aspartat aminotransferaz (AST) aspartik asidin amino grubunun  $\alpha$ -ketoglutarik aside transferini katalizleyerek glutamik ve okzaloasetik asitleri meydana getirir.

AST'nin doku dağılımı kalp, karaciğer ve iskelet kası dokularıdır. Bu dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulunmaları ile tanısal yarar taşımaktadır. Özellikle miyokard enfarktüsünde laktat dehidrogenaz, kreatin fosfokinaz ve kreatin fosfokinazın izozimi CK-MB ile birlikte klinikte kalp krizi belirteçleri olarak görülmektedir. AST enfarktüstten 6–8 saat sonra kanda artmaya başlamaktadır. 24–48 saatte en yüksek düzeye ulaşmaktadır. AST değerleri 3–4 gün içinde normale dönmektedir (Çizelge 2.4.1).

**Çizelge 2.4.1:** AST'nin anormal kan düzeylerine ait klinik bozukluklar (Adam ve Ardıçoğlu 2002).

ARTIŞ DURUMU	
AST	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fulminal viral hepatitler</li> <li>• Karaciğer hücre nekrozuna neden olan durumlar</li> <li>• Kronik hepatit</li> <li>• İlaça bağlı hasar</li> <li>• Alkolik hepatit</li> <li>• Kronik viral hepatit</li> <li>• Akut MI</li> <li>• Kalp yetmezliği</li> <li>• Tifo</li> <li>• Talasemi</li> <li>• Toksik şok sendromu</li> </ul>

### 2.4.2. Alanin aminotransferaz

Alanin aminotransferaz (ALT), alaninin amino grubunu  $\alpha$ -ketoglutarik aside transfer ederek glutamik ve pirüvik asitlerin oluşumunu sağlar.



ALT'de AST gibi karaciğer ve böbrek dokularında dağılım göstermektedir. Ancak ALT karaciğer dokusunda daha zengin olarak bulunmaktadır. Karaciğerin parankimal hasarı ile birlikte inflamatuvar olaylarda çok belirgin olan ALT düzeyinde artış, AST değerinden daha fazladır. Aşırı hücre hasarında mitokondrial AST salınımı arttığı için AST/ALT oranı yükselmektedir (Çizelge 2.4.2).

**Çizelge 2.4.2:** ALT'nin anormal kan düzeylerine ait klinik bozukluklar (Adam ve Ardiçoğlu 2002).

	ARTIŞ DURUMU	AZALIŞ DURUMU
ALT	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Viral hepatit</li> <li>• Toksik hepatit</li> <li>• Karaciğer şoku</li> <li>• Siroz</li> <li>• Şiddetli pankreatit</li> <li>• Alkol kullanımı</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Terminal karaciğer hastalığı</li> <li>• Renal hemodializ ve/veya renal yetersizlik</li> </ul>

### 2.4.3. Laktat dehidrogenaz

Laktat dehidrogenaz (LDH) tüm vücut dokularında bulunan bir enzimdir. Miyokard enfarktüsünde serum LDH konsantrasyonu, enfarktüs meydana geldikten sonra 24 saat içinde yükselir ve 5–6 gün içinde normal sınırlara geri döner. Yüksek LDH düzeyleri, nüks halindeki akut ve kronik lösemili hastalarda ve arasıra kliniksel yönden en yüksek noktaya vardığı sırada akut hepatitte de meydana gelebilir; fakat başka nedenlere bağlı sarılıkta meydana gelmez. Serum LDH, akut ateşli ve kronik enfeksiyöz hastalarda olduğu kadar anemili akciğer enfarktüsü, lokalize neoplastik hastalıklı ve kronik hastalık olayları bulunan hastalarda da normaldir (Çizelge 2.4.3).

**Çizelge 2.4.3:** LDH'nin anormal kan düzeylerine ait klinik bozukluklar (Adam ve Ardıçoğlu 2002).

	ARTIŞ DURUMU	AZALIŞ DURUMU
<b>LDH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Orak hücre anemisi</li> <li>• Miyokard infarktı</li> <li>• Lösemi, metastatik karsinom vb. malignant hastalıkları</li> <li>• Karaciğer şoku</li> <li>• Hepatite bağlı bozukluk</li> <li>• Enfeksiyöz mononukleaz</li> <li>• Progresif musküler distrofi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genetik eksiklik</li> </ul>

#### 2.4.4. Gamma-glutamil tranferaz

Gamma-glutamil tranferaz (GGT), karaciğer hastalıklarının tanısında yer alan önemli bir enzimdir. Tüm hepatobilier olayların tanısında diagnostik duyarlılığı en yüksek enzimdir. GGT konsantrasyonu böbrekte çok yüksek olmasına rağmen karaciğer, serum düzeyinin belirlenmesinde en büyük katkıyı sağlamaktadır. İntrahepatik veya posthepatik tıkanmalarda konsantrasyonu normalin 5–30 katına kadar artan GGT, tıkanma sarılığı, kolesistit ve kolanjintin belirlenmesinde daha erken ve daha uzun süreli yükseldiği için alkalen fosfataz, lösin aminopeptidaz ve transaminazlardan daha duyarlıdır.

Alkolik sirozlu hastaların yanı sıra aşırı alkol kullananlarda da artan serum GGT düzeyi, alkol kullanımının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Enzimin seruma salınımı, alkolün karaciğer hücrelerindeki mikrozomal yapılara olan toksik etkisini veya enzimatik indüksiyonu yansıtmaktadır.

#### 2.5. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen ürünleri oluşumu ve antioksidatif savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. Reaktif oksijen ürünleri olarak

hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ) ve nitrik oksit (NO) in vivo koşullarda sürekli olarak oluşmaktadır (Yıldız ve Çamsan, 2002).

Oksidatif stres, hücrelerin lipidler, proteinler, DNA, karbonhidratlar ve enzimler gibi tüm önemli bileşikleri üzerine tahrip edici etkiye sahiptir. Lipid ve proteinlerdeki tahribat primer tahribattır. Özellikle lipidler bu tahribata karşı en hassas olan makromoleküllerdir. Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları kolayca oksidasyona uğrar ve peroksidasyon ürünleri oluşur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendine devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonunda meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür.

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal sonucu membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesi ile dien konjugatları ve daha sonra lipid radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine dönüşürler.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerinin yıkımı, geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehidler oluşur. Bu bileşikler, ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüz olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbütirik asitle ölçülebilen malondialdehid (MDA) meydana gelir. Bu metod, lipid peroksid seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır (Akkuş 1995).

Proteinlerin radikallerden etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Serbest radikaller, amino asitlerin oksidasyonu yanında, peptit bağlarının hidrolizi, disülfid bağlarının oluşumu ve çapraz bağlanmalara yol açabilir (Akkuş,1995).

Serbest radikaller, aynı zamanda nükleik asit bazlarının modifikasyonu ve DNA zincir kırılmasına yol açar. DNA polimerazı inhibe edebilir (Akkuş,1995).

Oksidatif stres birçok hastalıkta önem taşımaktadır. Bunlar kardiyovasküler hastalıklar, enfeksiyonlar, kanser, diyabet ve nörodejeneratif patolojilerdir (Yıldız ve Çamsan, 2002).

### **2.5.1. Oksidatif strese karşı vücut savunması ve antioksidanlar**

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler (Akkuş, 1995). Antioksidanlar, önceleri hücrelerde peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe eden moleküller olarak tanımlanmışlardı. Günümüzde ise antioksidanların tanımı lipidlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir (Yalçın, 1998).

Antioksidan savunma:

1. Radikal metabolit üretiminin önlenmesi,
2. Üretilmiş radikallerin temizlenmesi,
3. Oluşan hücre harabiyetinin onarılması,
4. Sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması,
5. Endojen antioksidan kapasitesinin artırılması olarak beş değişik blokta yürür

(Gutteridge J.M. 1995).

Antioksidanlar, endojen kaynaklı (doğal) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki gruba ayrılabilir (Yapar, 2006):

### Endojen antioksidanlar

Antioksidanlar	Etki Mekanizmaları
1. Enzimler	
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Hidrojen peroksit detoksifikasyonu
Katalaz	Hidrojen peroksit detoksifikasyonu
Sitokrom oksidaz	Hücre $O_2$ 'nin %95-98'nin detoksifikasyonu
Süperoksit dismutaz(SOD)	Süperoksit anyonlarının detoksifikasyonu
2. Enzim olmayanlar	
• Lipid fazda bulunanlar	
$\alpha$ - tokoferol	$O_2^{\cdot-}$ ve $\cdot OH$ toplayıcı etki
$\beta$ -karoten	$O_2^{\cdot-}$ ve $\cdot OH$ toplayıcı etki
$\alpha$ -lipoik asit	$\cdot OH$ ve $^1O_2$ toplayıcı
• Sıvı fazda (hücre sitoplazmasında veya kan plazmasında) bulunanlar	
Albumin	LOOH toplayıcı etki
Askorbik asit	LOOH toplayıcı etki
Bilirubin	$O_2^{\cdot-}$ ve $\cdot OH$ toplayıcı etki
Ferritin	Doku demirinin bağlanması
Glutasyon	GSH-Px aktivitesinin desteklenmesi, $O_2^{\cdot-}$ ve $\cdot OH$ ile direkt reaksiyona girmesi
Laktoferrin	Dolaşımdaki serbest demirin bağlanması
Melatonin	SOD ve GSH-Px aktivitesini arttırmak
Seruloplazmin	Dolaşımdaki demirin bağlanması
Sistein	SOD benzeri aktivite
Transferin	Dolaşımdaki serbest demirin bağlanması
Ürat	$O_2^{\cdot-}$ ve $\cdot OH$ toplayıcı etki

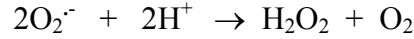
**Eksojen antioksidanlar**

<b>Antioksidan</b>	<b>Etki Mekanizmaları</b>
Ksantin Oksidaz İnhibitörleri Allopurinol Oksipurinol Pterin aldehid Tungsten	Ksantin oksidazla süperoksit üretiminin inhibisyonu
NADPH Oksidaz İnhibitörleri Adenozin Kalsiyum kanal blokerleri Lokal anestezikler NADPH oksidaz monoklonal antikor Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar	Nötrofil ve makrofajlarda NADPH ile süperoksit üretiminin inhibisyonu
Süperoksit Dismutaz (SOD) Doğal SOD IgA'ya bağlı SOD Lipozom kapsüllü SOD Polietilen glikol SOD (PEG-SOD)	$O_2^{\cdot -} + 2H \rightarrow H_2O_2$ reaksiyonunun katalizlenmesi
Katalaz Doğal katalaz Lipozom kapsüllü katalaz Polietilen glikol katalaz (PEG-katalaz)	$2H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$ reaksiyonunun katalizlenmesi
Nonenzimatik Serbest Radikal Toplayıcılar Albumin 17-aminosteroidler (Lazoroidler) Bilirubin Glutasyon Mannitol Ürat	LOOH toplayıcı etki LOOH ve $O_2^{\cdot -}$ toplayıcı etki $O_2^{\cdot -}$ ve $\cdot OH$ tutucusu $O_2^{\cdot -}$ ve $\cdot OH$ toplayıcı etki $\cdot OH$ toplayıcı etki $O_2^{\cdot -}$ ve $\cdot OH$ toplayıcı etki
Demir Redoks Döngüsünün İnhibitörleri Desferroksamin Seruloplazmin	Serbest demir bağlama
Glutasyon Peroksidaz Aktivitesini Artıranlar Glutasyon	GSH-Px aktivitesinin artırılması

Oksidatif stresin meydana getirdiği hasarlar vücudun antioksidan savunma mekanizması ile engellenir. Enzimatik savunma mekanizmasına ait olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimler, lipid peroksidlerin ortadan kaldırılması ve onların detoksifiye edilmesini sağlayan anahtar enzimlerdir (Sivaprasad, 2004).

#### **2.5.1.1. Süperoksit dismutaz (E.C. 1. 15. 1. 1)**

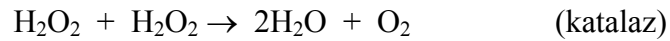
SOD, süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit dismutasyonunu katalizleyen bir metaloenzimdir (Akkuş, 1995 ).



SOD'un memeli hücrelerinde, üç izoenzimi tanımlanmaktadır. Bunlar; mitokondrilerde bulunan MnSOD, sitozolde ve nukleusta bulunan Cu-Zn SOD ve ekstrasellüler Cu-Zn SOD'dur (Grayck vd. 2005).

#### **2.5.1.2. Katalaz (E.C. 1. 11. 1. 6) ve glutatyon peroksidaz (E.C. 1. 11. 1. 9)**

Süperoksit radikallerinin dismutasyonu sonucu ya da doğrudan oluşan  $\text{H}_2\text{O}_2$ , katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından suya dönüştürülerek detoksifiye edilir.



Hücre içinde katalaz kısmen sitosolde daha çok peroksizomlarda bulunurken, glutatyon peroksidaz etkin bir şekilde sitozolde ve mitokondrilerde lokalize olmuştur. Düşük düzeyde  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den hücrelerin korunmasında GPx, katalazdan daha büyük öneme sahiptir. Katalazın daha çok,  $\text{H}_2\text{O}_2$  oluşumunun arttığı durumlarda etkin olduğu kabul edilmektedir (Akkuş, 1995).

### 2.5.1.3. Glutasyon redüktaz (E.C. 1. 6. 4. 2)

Hidroperoksidlerin redükte olması ile meydana gelen GSSH, glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüştürülür (Akkuş, 1995).



### 2.6. $\alpha$ -Lipoik Asit

1950 yılında, Teksas Üniversitesinin Kimya Bölümünden Dr. Lester Reed ve ark. glikoz metabolizmasında etkili olan bir bileşiği izole ettiler ve bunu  $\alpha$ -lipoik asit (LA) olarak adlandırdılar (Packer vd., 1999). Lipoik terimi lipit veya yağa tekabül etmektedir, çünkü LA su içinde çözünmez. 1950'den beri LA hakkında yüzlerce makale yayınlamıştır. Başlangıçta bilim adamları şeker metabolizmasında LA'nın rolüne odaklanmışlardır. 1980'li yıllarda LA'nın güçlü bir antioksidan yeteneğinde olduğu keşfedilmiştir.

Çeşitli hasta grupları araştırmacılar tarafından incelenmiştir, bu hastalarda LA'ın enfeksiyonlarda, iltihaplanmada, kardiyovasküler hastalıklarda, tümörlerde, alerjilerde, mide ülserlerinde, diabette, katarakta, sinir dejenerasyonunda ve radyasyon hasarlarında koruyucu etkisi incelenmiştir (Kumaran vd., 2004).

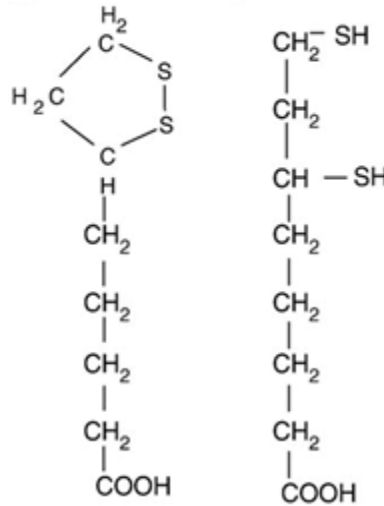
LA kolay bir şekilde besinlerden absorbe edilebilir ve aynı zamanda kan-beyin bariyerinden geçebilme özelliğine sahiptir (Akpınar vd., 2007). Bununla birlikte LA'nın bitki ve hayvanlarda sentez edildiği saptanmıştır. Bitki ve hayvan dokularında lizin  $\epsilon$ -amino grubuna kovalent bağlı bir maddedir (Moini vd., 2002). LA  $\alpha$ -ketoglutaratın ve dallı zincirli  $\alpha$ -ketoasitlerinin oksidatif dekarboksilasyonunu katalizleyen mitokondrial bir kofaktörü olarak işlev görmektedir (Yi and Maeda 2005).



## 2.6.1. Alfa lipoik asidin moleküler yapısı ve fonksiyonları

### 2.6.1.1. Yapı ve temel biyokimyasal özellikler

$\alpha$ -Lipoik asit (Şekil 2.6.1.1.) fizyolojik sistemlerde bulunan, tiyol grubu içeren ve antioksidan aktivitesi olan önemli bir moleküldür (Liang ve Akaike, 2000). Nispeten küçük bir moleküldür (MA: 206). Yükseltgenmiş formunda intermoleküler disülfid bağı oluşturan, disülfid türevi bir oktanoik asittir. Alfa lipoik asidin tanımlanan kimyasal yapısı 1,2 ditiyolan-3 valerik asit, 1,2 ditiyolan-3-pentanoik asid, DL-tiyoletik asid veya 6,8-ditiyoktanoik asid olarak adlandırılmıştır (Packer vd., 1995). LA' in iki izomerik konfigürasyonu vardır. R formu doğal, S formu ise sentetiktir. Her iki enantiomer, şimdiye kadar çalışılmış bütün hücre ve dokularda dihidroksilipoik asit (DHHLA)'e çevrildiği gösterilmiştir. LA' in okside olmuş ditiyolan halkası çevresel şartlara bağlı olarak moleküle yüksek bir indirgeme özelliği kazandırmaktadır. LA'in kimyasal reaktivitesini sağlayan ditiyolan halkasıdır. Halkadaki iki kükürt atomunun pozisyonu istisnai bir yüksek elektron yoğunluğu oluşturur. Bu yapı LA' i diğer bilinen tiyol içeren (glutatyon, sistein gibi) biyomoleküller arasında özgün kılmaktadır (Yapar, 2006).



**Şekil 2.6.1.1:**  $\alpha$ -Lipoik asidin kimyasal yapısı (Gonzalez-Perez ve Gonzalez-Castaneda, 2006).

Lipoik asit aynı zamanda pirüvat oksidasyonunda rol oynayan pirüvat dehidrogenaz kompleksinde yer alan koenzimlerden biridir. LA, dihidrolipoil transasetilaz ( $E_2$ ) enziminde yer alır. LA ile apoenzimin bir lisin amino grubu arasında kurulan bir amid bağı aracılığı ile koenzim molekülü oluşur.

#### **2.6.1.2. LA' in metabolizması**

$\alpha$ -Lipoik asit insan diyetinde yeterli miktarda bulunmasına rağmen, de novo olarak mitokondride lipoik asit sentaz tarafından sentezlenmektedir. Bitkiler ve hayvanlar LA' i sentezleyebilmektedir. Kırmızı et, karaciğer, patates, brokoli ve domateste bol miktarda bulunur. Dokularda da sırası ile böbrek, kalp, karaciğer, dalak beyin, pankreas ve akciğerde bulunmaktadır (Kramer, 2001; Moini vd., 2002). LA barsakta kolayca emilerek hücrelere taşınır ve sitozolik enzimler olan GSH redüktaz, tiyoredoksin redüktaz ve mitokondrial enzim olan  $E_3$  (dihidrolipoik dehidrogenaz) tarafından indirgenir. Mitokondrial enzim  $E_3$ , NAD(P)H harcayarak LA' i DHLA' de indirger. LA aynı zamanda NADPH' a bağımlı enzim GSH redüktaz için bir substrattır. LA ve metabolitleri karaciğerde depolanır. Lipoat metabolizmasındaki katabolik süreçler büyük oranda pentanoik asit yan zincirinin  $\beta$ -oksidasyonu üzerinden gerçekleşmektedir. İnsan metabolizmasında LA' in ana metaboliti 3-ketolipoat' tır. Bu metabolit serbest LA' in  $\beta$ -oksidasyonla yıkıma uğradığını göstermektedir (Packer vd., 1999).

#### **2.6.2. LA' in fonksiyonları**

##### **2.6.2.1. LA' in diğer antioksidanlar üzerine etkisi**

Lipoik asit, C vitamininin oksitlenmiş formu olan dehidroaskorbik asitten C vitaminini üretebilir (Busse vd. 1992).

Lipoik asit glutatyon düzeyini artırır. Glutatyon hücrelerimizde normal olarak bulunan, serbest radikal ve toksinlerin tüm tiplerini etkisiz hale getiren önemli bir antioksidandır. Glutatyonun dışardan ilaveleri, glutatyonun hücre membranları geçme yeteneğine sahip olmaması nedeni ile yararlı değildir. Aşırı stres, radyasyon ya da toksik maddelere maruz kalındığında LA'nın glutatyon düzeyini arttırması önemlidir (Karaca, 2009).

#### **2.6.2.2. LA çeşitli hastalıklarda koruyucu etkisi**

$\alpha$ -Lipoik asit, diyabet, nörolojik hastalıklar (unutkanlık, yaşlanma vb.), Parkinson hastalığı, retinal hücre hasarı, multipli sklerosis, obezite, hipertansiyon ve hiperglisemi, bronşial astım, mikotoksikozis ve derideki hasarlar gibi daha pek çok hastalık üzerinde koruyucu etkiye sahiptir (Packer vd., 1995).

#### **2.6.2.3. LA'in protein glikozilasyonunu engelleyici etkisi**

Glikoz, glikasyon üretmek için kollagen gibi bazı proteinlerle reaksiyona girme yeteneğinden dolayı yaşlanma ile ilişkilidir. Çünkü glikoz molekülü proteinlerin bazı amino asitlerine bağlanır ve proteini daha az fonksiyonel yapar, bozukluğa yol açar. Bu bağlanmanın başlangıç fazı glikasyon olarak adlandırılır.

Yaşlandığımız zaman vücudumuzdaki proteinlerin glikasyon miktarı ve kan şekeri artmaktadır. Tendonlarımızda ve arterlerimizdeki kollagenin glikasyonu yaş ile artar, kan glikozundaki artış oranında yaşlanma ile meydana gelir.

Bununla birlikte, kalori sınırlandırılması glikasyonda yaş ile ilgili artışı engelleyebilir. Başka bir deyişle aşırı şeker ve aşırı kalori tüketiminin önüne geçme teorik olarak yıllarca proteinlerimizin sağlıklı bir şekilde kalmasına yardım eder.

#### **2.6.2.4. LA ağır metallere karşı koruyucu etkisi**

LA ve DHLA, mangan, çinko, kadmiyum, kurşun, kobalt, nikel ve demir iyonları ile kompleks oluşturarak doku hasarı veya enzim inaktivasyonuna neden olan serbest radikal oluşumunu engeller (Patrick, 2002).

### **2.7. Glikozaminoglikanlar (GAG)**

Glikozaminoglikanlar tekrarlayan disakkarit birimlerin dallanmamış zincirlerini içeren polisakkaritlerdir. İçerdikleri karbonil ve sülfat grubundan dolayı çok fazla negatif yüklüdürler. Hücredeki en anyonik moleküllerdir. Yapılarında bulunan şekerlerden biri amino şeker (N-asetilglukozamin veya N-asetilgalaktozamin), diğeri ise üronik asittir.

GAGlar (hiyalüranan hariç) sülfat grubu taşırlar ve proteoglikanları oluşturmak için çekirdek proteinlere nötral trisakkaritler yoluyla ile kovalent bağlanırlar (Worrall vd., 1994). Proteoglikanlar hücre matriks bileşeni olmalarına rağmen bazı proteoglikanlar hücrelerin adezyonu ve sinyal iletiminde rol alırlar (Sakızlı ve Atabey, 2006).

#### **2.7.1. Kondroitin-4-sülfat (C4S)**

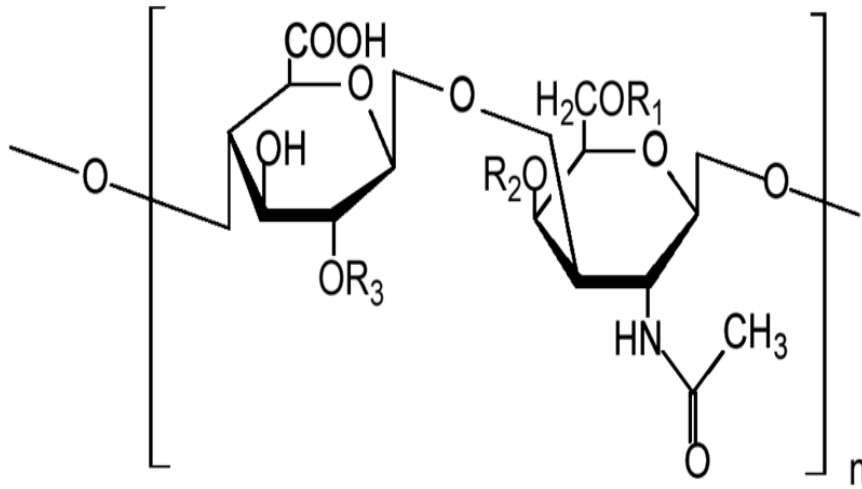
Kondroitin sülfat (CS), kıkırdak dokusunun en önemli ara maddesidir ve kıkırdak dokunun elastikiyetinde rol oynayan bir bileşiktir. Kondroitin sülfat düzeylerinin kıkırdak dokuda azalması yaşlı insanlarda önemli eklem hastalıklarının oluşması için büyük bir risk faktörüdür. Kondroitin sülfat pek çok biyolojik cevaba sahiptir (Ha ve Lee, 2003). Kıkırdak dokuda ortalama kırk kadar kondroitin sülfat birimi tek bir çekirdek proteinine bağlanır. Böylece oluşan proteoglikan yapılar bağlama proteinleri aracılığı ile omurga konumundaki hiyaluronik asit ile ilişki kurarak büyük bir

proteoglikan kümesi oluşturlar.

([http://www.akdeniz.edu.tr/tip/biyokimya%20an/DersNotlari/Aslan%20Aksunun\\_ders%20notlari/CRBCHEM.pdf](http://www.akdeniz.edu.tr/tip/biyokimya%20an/DersNotlari/Aslan%20Aksunun_ders%20notlari/CRBCHEM.pdf)).

CS, üronik asit ( $\beta$ -D-glukuronik asit)ve  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)bağları ile bağlı  $\alpha$ -D-N-asetilgalaktozaminin sülfat bakiyelerine farklı şekillerde bağlanması ile oluşan heteropolisakkarit bileşiğidir (Ha ve Lee, 2003). Tekrarlayan ünite  $\beta$  glukuronik asit ve N-Asetilgalaktozamindir. Sülfat kökü 4. veya 6. karbonlarına bağlandığı için kondroitin-4-sülfat (C4S) (Şekil 2.7.1) ve kondroitin-6-sülfat (C6S) olmak üzere iki tipi vardır.

([http://www.akdeniz.edu.tr/tip/biyokimya%20an/DersNotlari/Aslan%20Aksunun\\_ders%20notlari/CRBCHEM.pdf](http://www.akdeniz.edu.tr/tip/biyokimya%20an/DersNotlari/Aslan%20Aksunun_ders%20notlari/CRBCHEM.pdf))



**Şekil 2.7.1:** Kondroitin-4-sülfatın kimyasal yapısı.

([http://www.akdeniz.edu.tr/tip/biyokimya%20an/DersNotlari/Aslan%20Aksunun\\_ders%20notlari/CRBCHEM.pdf](http://www.akdeniz.edu.tr/tip/biyokimya%20an/DersNotlari/Aslan%20Aksunun_ders%20notlari/CRBCHEM.pdf))

C4S yumuşak bağ dokuda ekstraselüler matriksin sülfatlanmış temel GAG'ıdır. C4S, C6S ve dermatan sülfat (DS) predominant formlardır. C4S, C6S ve DS sınırlı ve karakteristik doku dağılımı gösterir. C4S ve DS kollajenöz interstisyel matrikste, lenfosit adezyonunda etkili olmasından dolayı venül endotellerinde bulunur (Worrall vd., 1994). C6S plateletlerde bulunur, bununla birlikte platelet aktivasyonu sırasında serbest kalır (Donato vd., 1996). C4S, insan plazmasının temel glikozaminglikanlarındanr. C4S ve diğer glikozaminglikan düzeylerinin plazma veya dokulardaki artışı çeşitli hastalıkların belirtisi olarak yorumlanabilir (Campo vd., 2004).

### 3. MATERİYAL VE METOD

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi “Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu” nun 18.02.2008 tarih ve 2008/02.10 nolu kararı ile etik kurul onayı almıştır. Çalışmada, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Biriminden temin edilen, 200–350 gr. ağırlığındaki ergin Wistar *albino* erkek sıçanlar kullanıldı. Bakım ve beslenmeleri T.Ü. Deney Hayvanları Biriminde gerçekleştirilen hayvanlar, deney süresi boyunca içilebilir çeşme suyu ve standart pellet yem ile beslenerek 21°C sıcaklıkta ve 12 saat gündüz 12 saat gece ışık periyodunda barındırıldı.

Deney grupları aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı:

1. **Grup (n=10): Kontrol Grubu**
2. **Grup: Benomil Grubu (n=10):** Beş hafta süreyle haftada bir kez olmak üzere intraperitoneal (IP) enjeksiyon yoluyla, benomil (Cornell) 200 mg/kg’lık dozda (Banks ve Soliman 1997) mısır yağı (1.5 ml/kg) içerisinde (Lim ve Miller 1996) çözülerek hayvanlara uygulandı.
3. **Grup: Benomil +  $\alpha$ -Lipoik asid (LA) Grubu (n=10):** Beş hafta süreyle haftada bir kez olmak üzere intraperitoneal (IP) enjeksiyon yoluyla  $\alpha$ -Lipoik asid (Fluka) 200 mg/kg’lık dozda (Manda ve ark. 2007) serum fizyolojik (1.0 ml/kg) içerisinde (Campo ve ark., 2004) çözülerek hayvanlara uygulandı. Uygulamadan 30 dk. sonra (Rybak vd., 1999), benomil 200 mg/kg’lık dozda (Banks ve Solkiman 1997) mısır yağı (1.5 ml/kg) içerisinde (Lim ve Miller 1996) çözülerek uygulandı.
4. **Grup: Benomil + Kondroitin-4-Sülfat (C4S) Grubu (n=10):** Beş hafta süreyle haftada bir kez olmak üzere intraperitoneal (IP) enjeksiyon yoluyla kondroitin-4-Sülfat (Fluka) 25 mg/kg’lık dozda serum fizyolojik (1.0 ml/kg) içerisinde (Campo ve ark. 2004) çözülerek hayvanlara uygulandı. Uygulamadan 30 dk. sonra (Rybak vd., 1999), benomil 200 mg/kg’lık dozda (Banks ve Soliman 1997) mısır yağı (1.5 ml/kg) içerisinde (Lim ve Miller 1996) çözülerek uygulandı.

**5. Grup: Benomil + LA + C4S Grubu (n=10):** Beş hafta süreyle haftada bir kez olmak üzere intraperitoneal (IP) enjeksiyon yoluyla  $\alpha$ -Lipoik asid (Fluka) 200 mg/kg'lık dozda (Manda ve ark. 2007) serum fizyolojik (1.0 ml/kg) içerisinde çözülerek hayvanlara uygulandı. Daha sonra kondroitin-4-Sülfat (Fluka) 25 mg/kg'lık dozda serum fizyolojik (1.0 ml/kg) içerisinde (Campo ve ark. 2004) çözülerek uygulandı. LA ve C4S uygulamasından 30 dk. sonra (Rybak vd., 1999), benomil 200 mg/kg'lık dozda (Banks ve Soliman 1997) mısır yağı (1.5 ml/kg) içerisinde (Lim ve Miller 1996) çözülerek uygulandı.

5 haftalık deney süresi sonunda, vücut ağırlıkları ölçülerek Rompun (5 mg/kg) ve ketasol (1 ml/kg) kullanımı ile anestezi altına alınan hayvanların kalp kanı alındı (yaklaşık olarak 5 cc); karaciğer, dalak, böbrek, testis ve kalp dokuları çıkartıldı. Kan örnekleri 3500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi (Balkan ve Aktaş, 2005) ve elde edilen serumlar incelenmek üzere -80°C de saklandı. Çıkarılan dokuların öncelikle total ağırlıkları alındı. Karaciğer ve böbrek dokuları, enzimatik incelemeler için serum fizyolojik içine konularak -80 °C de saklanmak üzere derin dondurucuya kaldırıldı; mikroskobik inceleme için ise fiksatife alındı.

### **3.1. Hepatik Hücre Hasarının Belirlenmesi:**

Hepatik hücre hasarının belirlenmesi için, boş tüplere alınan kalp kanı örnekleri 10 dk. 3500 rpm de santrifüj edildi. Daha sonra elde edilen serumda enzim aktiviteleri [aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), gamma-glutamil transferaz (GGT) ve laktat dehidrogenaz (LDH)] otoanalizör (Thermo-Konelab Prime 60i ) ile incelendi.



### 3.2. Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi:

Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi için öncelikle -80 °C de saklanan karaciğer ve böbrek dokuları derin dondurucudan çıkarılarak oda ısısında çözündürüldü ve tartıldı. Tartılan dokular 0,15 M KCl (%10 oranında) içinde 4000 rpm 5 dk. 600 motor hızı ile cam-cam homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Homojenatlar +4 °C' de 13000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.

Dokulardan elde edilen süpernatantlarının ve kan serumlarının malondialdehid (MDA) değerleri, lipid peroksidasyonu ile oluşan MDA'nın sıcak ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu bileşiğin pembe-kırmızı renginin 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Cecil 5000 Series UV-VIS spectrophotometer) olarak ölçülmesine dayanan bir yöntem ile elde edilmektedir (Ohkawa vd., 1979).

#### **Kullanılan Çözeltiler**

- %8 SDS(sodyum dodesilsülfat)
- % TBA
- %20 asetik asit
- Butanol/piridin (15:1)

#### **Yöntem**

√ Kör ve örnek tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

Ayıracılar (ml)	Kör	Örnek
Su	0.2	-
Örnek	-	0.2
SDS	0.2	0.2
Asetik asit	1.5	1.5
TBA	1.5	1.5
Saf su	0.6	0.6
İnkübasyon	Kaynar su banyosunda 1 saat	
Soğutma	Çeşme suyu ile	
Su	1	1
Butanol/piridin	5	5
Santrifüj	4000×g, 10 dk. Üstteki organik faz alınır.	
Okuma	532 nm’de köre karşı okunur.	

### Hesaplama

$$\text{Serum için } C \text{ (nmol/ml)} = \frac{\Delta A \cdot V_t \cdot 10^9}{\epsilon \cdot d \cdot V_s \cdot 10^3}$$

$$\text{Dokular için } C \text{ (nmol/ gr yaş doku)} = \frac{C \text{ (nmol/ml)}}{\text{Doku (gr)}}$$

$\Delta A$  = Dakikadaki absorbands değeri

$V_t$  = Total reaksiyon hacmi

$\epsilon$  = Molar absorbsiyon katsayısı =  $1.56 \times 10^5$

$V_s$  = Reaksiyona giren örnek hacmi

$d$  = Işık yolu (cm)

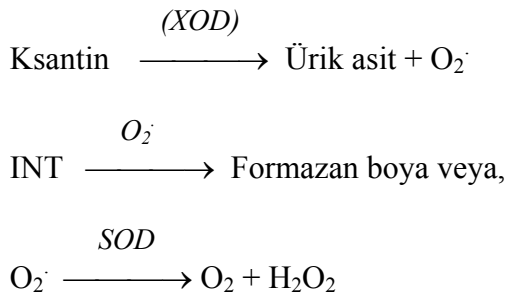
### 3.3. Antioksidan Savunmanın Belirlenmesi

Antioksidan savunmanın belirlenmesi için, karaciğer ve böbrek dokularında süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve katalaz (CAT) enzim aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Dokular derin dondurucudan çıkarılarak oda ısısında çözündürüldü. Çözündürülen dokulara enzim aktivitelerinin belirlenmesi için ortak bir ekstraksiyon işlemi uygulandı. 0.5 gr doku, 5 ml fosfat tamponu (0.05 M, pH: 7.4) içinde cam-cam homojenizatör (Glas-Col) kullanılarak homojenize edildi. Homojenatlar 13000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek süpernatantlar ayrıldı. Elde edilen süpernatantlar enzim aktivitelerinin ölçümü için kullanıldı.

#### 3.3.1. SOD enzim aktivitesinin ölçülmesi

SOD enzim aktivitesinin ölçülmesi için Ransod SD 125 ticari kiti kullanıldı.

Süperoksit dismutazın rolü; oksidatif enerji yolağı sırasında meydana gelen toksik süperoksit radikalının, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırmaktır. Bu metod 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol-5-feniltetrazolium klorür) (INT) ile reaksiyona girdiğinde kırmızı formazan boya formuna dönüşen süperoksit radikallerini oluşturmak için, ksantin ve ksantin oksidaz (XOD) kullanılır. Bundan sonra süperoksit dismutaz aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyonunun derecesi ile ölçülür (Woolliams vd., 1983).



#### Kullanılan ayraçlar

- R1a: Substrat: Tampon R1b'nin 20 ml'si ile R1a karıştırılır.

- R1b: Tampon: Kullanıma hazırdır.
- R2:Ksantin oksidaz: Distile suyun 10 ml'si R2ile karıştırılır.
- CAL: Standartlar: 10 ml redistile su ile standartdan bir tanesi sulandırılır ve bu S<sub>6</sub> olarak kabul edilir. Diğer standartların seri sulandırılması S<sub>6</sub> ile yapılır.
- 0.01 M fosfat tamponu (pH: 7.0): Bu tampon S<sub>1</sub> sulandırma tamponu olarak kullanılır.

### Yöntem

Sulandırma tamponu (S <sub>1</sub> )		
S <sub>6</sub>	10 ml distile ile sulandırılır.	-
S <sub>5</sub>	5 ml S <sub>6</sub>	5 ml
S <sub>4</sub>	5 ml S <sub>5</sub>	5 ml
S <sub>3</sub>	5 ml S <sub>4</sub>	5 ml
S <sub>2</sub>	3 ml S <sub>3</sub>	6 ml

Tüm standartlar hazırlanır. 505 nm'de 1 cm küvetlerde, havaya karşı spektrofotometrede OD değerleri ölçülür.

Sulandırma tamponu (S <sub>1</sub> )		Standartlar (S <sub>2</sub> -S <sub>6</sub> )	Sulandırılmış örnek
Sulandırılmış Örnek	—	—	0.05 ml
Standart	—	0.05 ml	—
S <sub>1</sub>	0.05 ml	—	—
R <sub>1</sub>	1.7 ml	1.7 ml	1.7 ml
Karıştırılır			
(R <sub>2</sub> )	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml

Karıştırılır, 30 sn sonra ilk absorbans değeri olan A<sub>1</sub> okunur. 3 dk. sonra ikinci absorbans olan A<sub>2</sub> okunur.

### **Hesaplama**

$$\frac{A_1 - A_2}{3} = \Delta A/min \quad (\text{hem örnekler hem standartlar için hesaplanır.})$$

$$100 - \frac{(\Delta A \text{ std/min} \times 100)}{\Delta A \text{ örnek/min} \times 100} = \% \text{ inhibisyon}$$

$$100 - \frac{(\Delta A \text{ örnek/min} \times 100)}{\Delta A \text{ S}_1/min \times 100} = \% \text{ inhibisyon}$$

S<sub>1</sub> (örnek sulandırma oranı) = İnhibe edilmemiş reaksiyon oranı = %100

Her bir standart için log 10'a karşı % inhibisyon eğrisi çizilir.

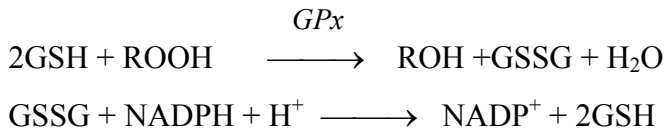
Standart eğriden elde edilen değer × Sulandırma faktörü = SOD unite/ml değeri elde edilir.

Bir ünite SOD aktivitesi, INT'nin 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol-5-feniltetrazolium klorür) belirtilen deney koşullarında (37°C, pH:7) indirgenmesinin % 50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı olarak tanımlanır.

### **3.3.2. GPx enzim aktivitesinin ölçülmesi:**

GPx enzim aktivitesinin ölçülmesi için Ransel RS 505 ticari kiti kullanıldı.

Bu metod Paglia ve Valentine (1967)'e dayanır. GPx, cumene hidroperoksit ile glutatyonun oksidasyonunu katalizler. Glutatyon redüktaz ve NADPH varlığında, okside glutatyon (GSSG), aynı anda NADPH'ın NADP<sup>+</sup>'ye oksidasyonu ile redükte forma döner. Absorbanstaki azalış 340 nm'de ölçülür.



### **Kullanılan ayıracılar**

- R1a: Reagent: R1b tamponu ile R1a karıştırılır.
- R1b: Tampon: Kullanıma hazırdır.
- R2: Cumene hidroperoksit: 10 µl R2 10 ml distile su ile iyice çalkalanarak karıştırılır.
- R3: Sulandırma ajanı: 200 ml distile su ile R3 karıştırılır. Daha sonra R3'ün 2 ml'si 0.05 ml örnekle karıştırılır.

### **Yöntem**

340 dalga boyunda, 1 cm küvette, 37°C'de, havaya karşı okuma yapılır.

Yarı-mikro		
	Sulandırılmış örnek	Kör
Sulandırılmış örnek	0.02 ml	-
Distile su	-	0.02
R1	1 ml	1 ml
R2	0.04 ml	0.04 ml

Karıştırılır, 1 dk. sonra örnek ve körün absorbansı okunur ve eş zamanlı olarak süre başlatılır. Daha sonra 1. dk. ve 2. dk. okuma yapılır. Son olarak 3 absorbans değerinin ortalaması alınır.

### **Hesaplama**

*Kör absorbansı –örnek absorbansın ortalaması = Absorbans*

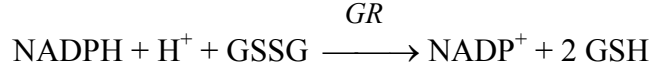
*8,412 × Absorbans = U/ml*

Bir ünite GPx aktivitesi, 37°C'de 1 dk. 1µmol NADPH'ı NADP'ye okside eden enzim miktarı olarak tanımlanır.

### **3.3.3. GR enzim aktivitesinin ölçülmesi:**

GR enzim aktivitesinin ölçülmesi için Randox GR 2368 ticari kiti kullanıldı.

GR, NADPH'in varlığında glutatyonun (GSSG) redüklenmesini katalizler. Absorbanstaki azalış 340 nm'de ölçülür (Goldberg ve Spooner, 1983).



### **Kullanılan ayıracılar**

- R1a: Tampon: Kullanıma hazırdır.
- R1b: Substrat: R1a tamponunun 5 ml'si R1b ile karıştırılır.
- R2: NADPH: 3ml distile su ile sulandırılır.

### **Yöntem**

340 dalga boyunda, 1 cm küvette, 37°C'de, havaya karşı okuma yapılır.

Örnek	40 µl
R1	1000 µl
İyice çalkalanır	
R2	200 µl

Karıştırılır ve eş zamanlı olarak süre başlatılır. 1 dk. sonra ilk absorbans okunur. Daha sonra 2, 3, 4 ve 5. dk. tekrar okuma yapılır. 5 tane absorbans değerinin ortalaması ( $\Delta A$ ) alınır.

### **Hesaplama**

$$U/ml = 4.983 \times \Delta A \text{ 340 nm/min}$$

Bir ünite GR aktivitesi, 37°C'de 1 dk. 1µmol GSSG'u GSH'na okside eden enzim miktarı olarak tanımlanır.

### **3.3.4. CAT enzim aktivitesinin ölçülmesi:**

Dokuda CAT aktivite tayini Aebi (1984) metoduna göre yapıldı. Bu yöntemin esası deney ortamına ilave edilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin CAT tarafından su ve oksijene parçalanması

sonucu 240 nm’de absorbens azalmasına dayanmaktadır. Absorbansta gözlenen azalma ortamdaki CAT enzim aktivitesi ile doğru orantılı bir eğilim göstermektedir.

### **Kullanılan çözeltiler**

- 50 mM pH 7.0 olan fosfat tamponu
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’li ve absorbens 0.500 olan fosfat tamponu: Spektrofotometre 240 nm’ye ayarlandı ve fosfat tamponu ile spektrofotometrenin sıfır absorbens okuması sağlandı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’li fosfat tamponu, absorbens 0.500 oluncaya kadar damla damla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek ayarlandı.

### **Yöntem**

Spektrofotometre 240 nm’ye ayarlandı ve fosfat tamponu ile kalibre edildi. 3 ml’lik küvete 2.99 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’li fosfat tamponu ve 0.01 ml 50 kat sulandırılmış numune ilave edilerek hızla karıştırıp absorbens okundu, bu başlangıç absorbens değeri olarak kabul edildi. Daha sonra 60 sn süreyle absorbens azalması takip edildi. Sürenin sonunda okunan absorbens değeri kaydedildi. Sonuçlar  $\kappa$ /mg protein şeklinde ifade edildi (Aydoğdu vd. 2007).

### **Hesaplama**

$$\kappa = \frac{2.3 \times \log \frac{\text{İlk absorbens}}{\text{Son absorbens}}}{\Delta t \text{ (ölçüm süresi, sn)}} \times \text{Sulandırma katsayısı}$$

Bir ünite katalaz aktivitesi pH 7,0’de 30°C 1 dakikada 1  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’in parçalanmasını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlanır.



### 3.4. Total Protein Değerlerinin Belirlenmesi:

Total protein tayini için karaciğer ve böbrek dokuları derin dondurucudan çıkarılarak oda ısısında çözündürüldü ve tartıldı. Dokular daha sonra %10'luk TCA içinde 4000 rpm'de 5 dk. 600 motor hızında cam-cam homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Homojenatlar 1300 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.

Doku süpernatantlarının total protein değerleri Lowry yöntemi (Lowry vd., 1951) ile ölçüldü. Proteinlerin yapısındaki aromatik halka içeren amino asitler Folin reaktifi (fosfomolibdotungustik asit) ile mavi renk verir. Bu reaksiyon amino asitlerin Folin reaktifi indirgemeleri esasına dayanır. Oluşan rengin spektrofotometrede verdiği absorbans şiddeti ile protein derişimi doğru orantılıdır.

#### **Kullanılan çözeltiler**

- A çözeltisi: %2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.1 N NaOH içerisinde)
- B çözeltisi: % 1'lik  $\text{CuSO}_4$ , % 2 sodyum potasyum tartarat (Eşit hacimde (1:1) karıştırılır). Bu çözelti her seferinde taze olarak hazırlandı.
- C çözeltisi: 50 ml A çöz. + 1 ml B çöz. Bu çözelti her seferinde taze olarak hazırlandı.
- Standart çözeltisi: % 100 mg Sığır Serum Albumin (BSA) içeren stok çözelti hazırlandı. Bu stoktan fizyolojik su ile seyreltmeler yapılarak % 5, % 10, % 15 ve % 20 BSA içeren çalışma standart çözeltileri hazırlandı.

#### **Yöntem**

√ Örnek, standart ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

Reaktifler	Örnek	Standart	Kör
Standart çözelti	-	0.5 ml	-
Doku homojenatı	0.1 ml	-	-
Distile Su	0.4 ml	-	0.5 ml
C çözeltisi	3 ml	3ml	3 ml
Vortekslenir ve 10 dk. oda ısısında bekletilir.			
Folin	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Vortekslenir ve 30 dk. oda ısısında bekletilir			
500 nm’de absorbands okunur.			

### **Hesaplama**

BSA (%mg) standart grafiği çizilerek total protein miktarı hesaplandı. Sonuç seyreltme katsayısı ile çarpıldı.

### **3.5. Histolojik İnceleme:**

Işık mikroskobu incelemeleri için çıkarılan karaciğer ve böbrek dokuları 24 saat % 10 formol’de fiks edildi. Alkol serilerinden geçirilerek (%50, 60, 70, 80, 90, 100), ksilolde şeffaflaştırıldı ve daha sonra parafine gömüldü. Parafin bloklardan 3–5 µ kalınlığında kesitler alınarak hematoxilen-eozin ile boyandı. Hazırlanan preparatlar OLYMPUS marka fotomikroskopta fotoğrafları çekilerek bulguları değerlendirildi.

### 3.6. İstatistiksel Analizler:

Verilerin istatistiksel değerlendirmeleri için, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Bölümü'nde bulunan S0064 Minitab Released 13 (Lisans no:WCP 1331.00197) paket programı kullanıldı. Grup içi karşılaştırmalarda Wilcoxon T testi, gruplar arası karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalarda ise One-Way ANOVA testi kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler olarak (ortalama±standart sapma) değerleri verilmiştir.

#### 4. BULGULAR

Dört deney (benomil, benomil+LA, benomil+C4S, benomil+LA+C4S ) ve bir kontrol grubu halinde deneye alınan hayvanlardan, benomil+LA grubuna ait bir, benomil+C4S grubuna ait iki ve benomil+LA+C4S grubuna ait dört hayvan deney süresinin içinde öldüler (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1:** Kontrol ve deney gruplarına ait hayvan sayıları.

	Kontrol (K)	Benomil (B)	Benomil+LA (B+LA)	Benomil+C4S (B+C4S)	Benomil+LA+C4S (B+LA+C4S)
<b>Deney Başlangıcındaki Hayvan Sayısı</b>	10	10	10	10	10
<b>Deney Sonunda Yaşayan Hayvan Sayısı</b>	10	10	9	8	6

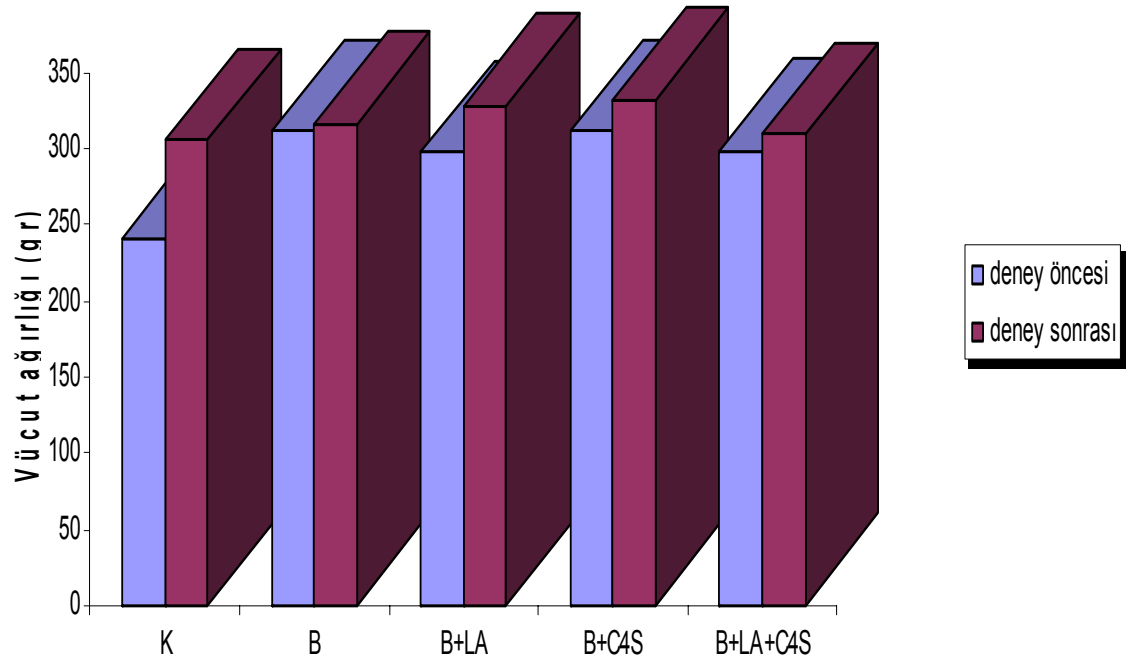
##### 4.1. Vücut Ağırlıkları

Beş haftalık deney süresinin başında ve sonunda hem kontrol grubu hem de deney gruplarındaki sıçanların vücut ağırlıkları ölçüldü. Vücut ağırlığındaki değişiklikler Çizelge 4.2’de ve Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Çizelgeden de izlenebileceği gibi, deney öncesi ve deney sonu hayvanların vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında, benomil grubu dışındaki diğer dört grupta istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmektedir. Benomil grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

**Çizelge 4.2:** Benomil, lipoik asit ve kondroitin 4-sülfatın sıçanlarda vücut ağırlığı üzerine etkileri (Tablodaki tüm değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir).

		Vücut ağırlığı (gr) (Deney öncesi)	Vücut ağırlığı (gr) (Deney sonu)
<b>Kontrol</b>	<b>(n=10)</b>	241,30 $\pm$ 25,25	305,50 $\pm$ 22,23*
<b>Benomil</b>	<b>(n=10)</b>	311,30 $\pm$ 33,88	316,60 $\pm$ 28,32
<b>B+LA</b>	<b>(n=9)</b>	297,55 $\pm$ 31,65	328,88 $\pm$ 40,44**
<b>B+C4S</b>	<b>(n=8)</b>	311,00 $\pm$ 30,43	332,23 $\pm$ 25,91**
<b>B+LA+C4S</b>	<b>(n=6)</b>	298,00 $\pm$ 23,40	339,50 $\pm$ 19,47***

\*P<0.005, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.02



**Şekil 4.1:** Sıçanların deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlıkları.

## 4.2. Organ Ağırlıkları

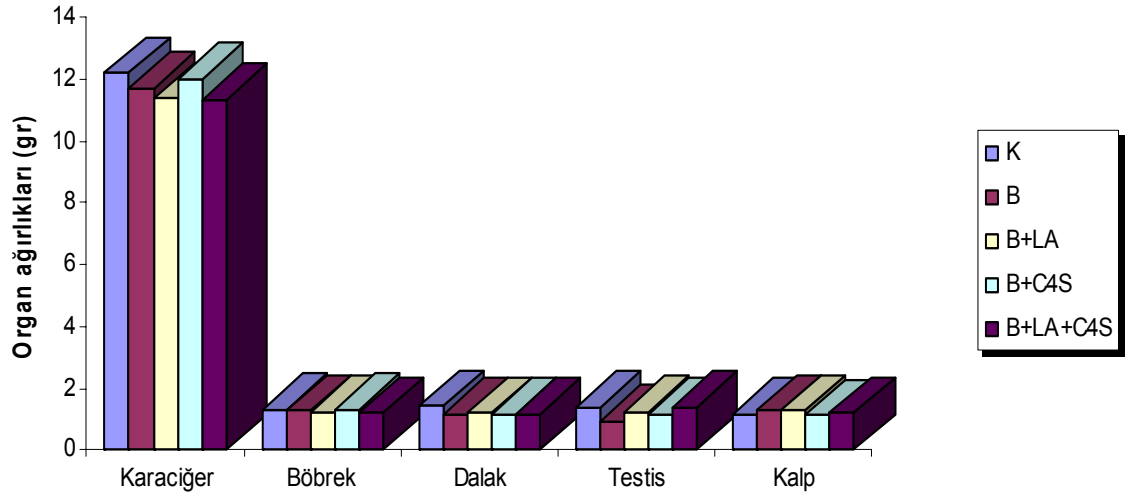
Deney süresinin sonunda tüm grupların karaciğer, böbrek, dalak, testis ve kalp dokularının ağırlıkları tartılmış ve gruplar arasındaki değişiklikler Çizelge 4.3.'de ve Şekil 4.2'de belirtilmiştir. Çizelgeden de izlendiği gibi, dalak ağırlığında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, benomil grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiş ( $p<0.001$ ), diğer gruplarda ise anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Testis ağırlığında, benomil grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ( $p<0.001$ ), ve diğer üç deney grubu ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p<0.01$ ).

**Çizelge 4.3:** Benomil, lipoik asit ve kondroitin 4-sülfatın sıçanların organ ağırlıkları üzerine etkileri (Tablodaki tüm değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir).

Organ/gr	K (n=10)	B (n=10)	B+LA (n=9)	B+C4S (n=8)	B+LA+C4S (n=6)
<b>Karaciğer</b>	12,03 $\pm$ 0,92	11,77 $\pm$ 0,97	11,36 $\pm$ 0,95	10,87 $\pm$ 4,37	11,33 $\pm$ 1,44
<b>Böbrek</b>	1,33 $\pm$ 0,13	1,29 $\pm$ 0,16	1,24 $\pm$ 0,19	1,33 $\pm$ 0,16	1,21 $\pm$ 0,09
<b>Dalak</b>	1,44 $\pm$ 0,13	1,16 $\pm$ 0,20 <sup>a*</sup>	1,20 $\pm$ 0,18	1,16 $\pm$ 0,27	1,17 $\pm$ 0,11
<b>Testis</b>	1,41 $\pm$ 0,09	0,85 $\pm$ 0,09 <sup>a*</sup>	1,25 $\pm$ 0,20 <sup>b**</sup>	1,19 $\pm$ 0,29 <sup>b**</sup>	1,38 $\pm$ 0,13 <sup>b**</sup>
<b>Kalp</b>	1,19 $\pm$ 0,07	1,30 $\pm$ 0,14	1,28 $\pm$ 0,12	1,19 $\pm$ 0,15	1,21 $\pm$ 0,17

\* $p<0,001$ , \*\* $p<0.01$

Karşılaştırmalar: <sup>a</sup> K- B grupları arasında; <sup>b</sup> B ile B+LA, B+C4S ve B+LA+C4S grupları arasında yapılmıştır.



**Şekil 4.2:** Organ ağırlıklarındaki değişiklikler.

#### 4.3. Hepatik Hücre Hasarının Belirlenmesi

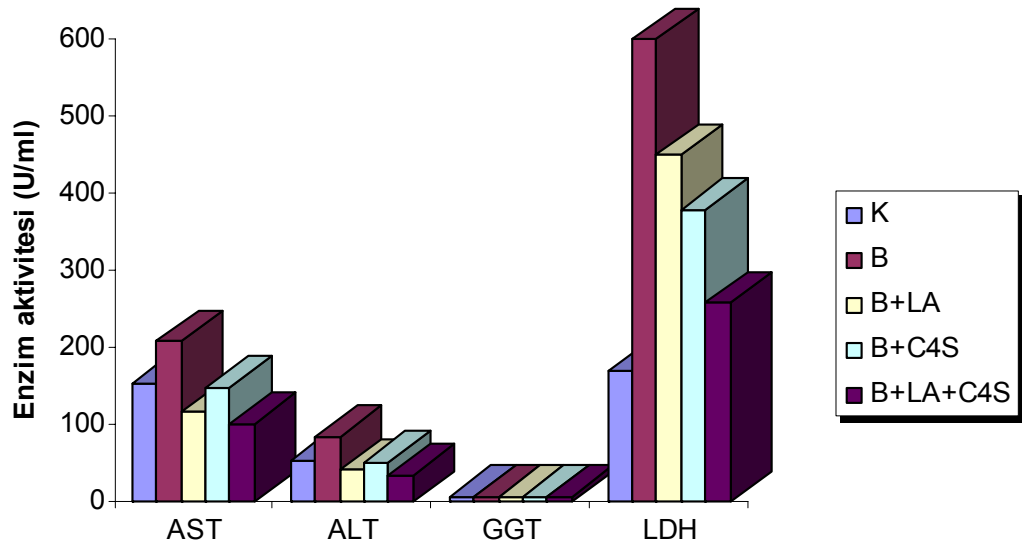
Hepatik hücre hasarının belirlenmesi için, karaciğerde AST, ALT, LDH ve GGT enzimlerinin aktiviteleri ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 4.4.'de ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Çizelgeden de izlenebileceği gibi AST, ALT ve LDH enzim aktiviteleri benomil grubunda kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ( $p < 0,005$ ) gözlenmektedir. Benomil grubu ile benomil+LA, benomil+C4S ve benomil+LA+C4S grupları karşılaştırıldığında ise, üç grupta da benomil grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış ( $p < 0,005$ ) tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile benomil+LA+C4S grubu karşılaştırıldığında da ise deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış ( $p < 0,005$ ) saptanmıştır. Beş grup arasında yapılan karşılaştırmalarda, GGT enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir ( $p > 0,005$ ).

**Çizelge 4.4:** Benomile bağlı hepatik hücre hasarında hepatik enzimlerdeki değişiklikler ve LA ve C4S'in enzim değerleri üzerindeki etkileri (Tablodaki tüm değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir).

Enzimler (U/ml)	K (n=10)	B (n=10)	B+LA (n=9)	B+C4S (n=8)	B+LA+C4S (n=6)
AST	153,40 $\pm$ 26,75	207,90 $\pm$ 21,05 <sup>a*</sup>	116,77 $\pm$ 19,25 <sup>b*</sup>	149,25 $\pm$ 25,18 <sup>b*</sup>	101,66 $\pm$ 13,12 <sup>bc*</sup>
ALT	53,50 $\pm$ 9,85	83,80 $\pm$ 7,48 <sup>a*</sup>	41,11 $\pm$ 10,21 <sup>b*</sup>	50,75 $\pm$ 8,24 <sup>b*</sup>	34,00 $\pm$ 3,22 <sup>b c*</sup>
GGT	6,4 $\pm$ 1,07	6,00 $\pm$ 0,94	6,11 $\pm$ 0,60	5,87 $\pm$ 0,64	5,83 $\pm$ 1,47
LDH	169,70 $\pm$ 591,14	600,80 $\pm$ 694,98 <sup>a*</sup>	450,66 $\pm$ 422,65 <sup>b*</sup>	380,87 $\pm$ 204,77 <sup>b*</sup>	258,16 $\pm$ 110,09 <sup>b*</sup>

\*p<0,005

Karşılaştırmalar: <sup>a</sup> K- B grupları arasında; <sup>b</sup> B ile B+LA, B+C4S ve B+LA+C4S grupları arasında; <sup>c</sup> K ile B+LA+C4S grupları arasında yapılmıştır.



**Şekil 4.3:** Hepatik hücre hasarına bağlı enzim değişiklikleri ve LA ile C4S'in etkileri.



#### 4.4. Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi

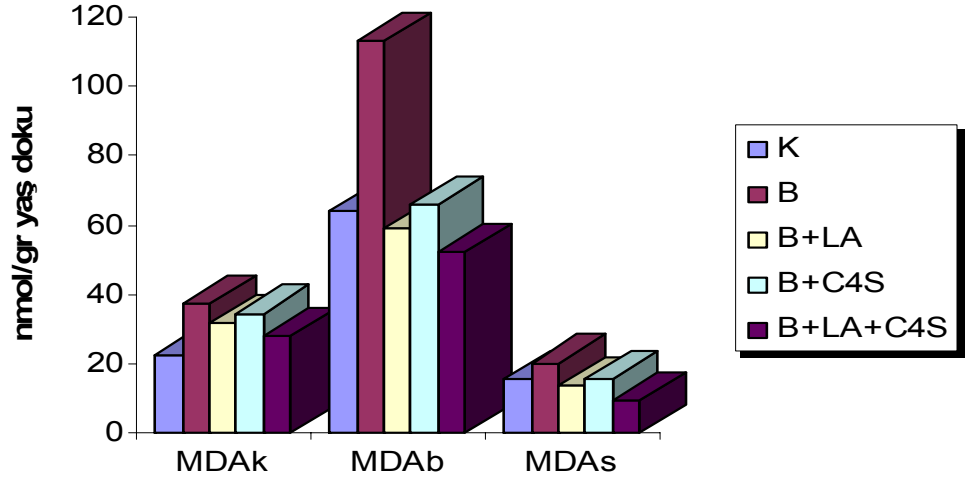
Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi için, beş haftalık deney süresinin sonunda tüm gruplarda karaciğer (MDA-k), böbrek (MDA-b) ve serum malondialdehid (MDA-s) düzeyleri ölçülmüş, sonuçlar Çizelge 4.5 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi, MDA-k düzeyinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında benomil grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmış ( $p<0,032$ ) ve benomil grubu ile diğer üç deney grubu karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ( $p<0.01$ ). MDA-b değerinde ise, benomil grubu kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış, buna karşılık diğer grupların benomil grubu ile kıyaslanmasında anlamlı bir azalma gözlenmiştir ( $p<0.001$ ). MDA-s düzeyine bakıldığında, yine benomil grubu kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış ( $p<0.001$ ), diğer grupların benomil grubu ile kıyaslanmasında anlamlı bir azalma gözlenmiştir ( $p<0.001$ ). Ayrıca, benomil+LA+C4S grubunun diğer tüm gruplara göre anlamlı bir azalma gösterdiği belirlenmiştir ( $p<0.001$ ).

**Çizelge 4.5:** Karaciğer, böbrek ve serum MDA değişiklikleri ile, LA ve C4S'in MDA değerleri üzerine etkileri (Çizelgedeki tüm değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir).

MDA (nmol/g yaş doku)	K (n=10)	B (n=10)	B+LA (n=9)	B+C4S (n=8)	B+LA+C4S (n=6)
<b>Karaciğer</b>	22,64 $\pm$ 8,86	37,28 $\pm$ 11,04 <sup>a*</sup>	31,61 $\pm$ 10,93 <sup>b***</sup>	34,50 $\pm$ 7,58 <sup>b***</sup>	27,84 $\pm$ 10,32 <sup>b***</sup>
<b>Böbrek</b>	64,12 $\pm$ 13,13	113,25 $\pm$ 24,00 <sup>a**</sup>	59,08 $\pm$ 20,61 <sup>b**</sup>	65,70 $\pm$ 15,28 <sup>b**</sup>	52,30 $\pm$ 21,11 <sup>b**</sup>
<b>Serum</b>	15,73 $\pm$ 2,24	20,28 $\pm$ 3,37 <sup>a**</sup>	13,72 $\pm$ 2,47 <sup>b**</sup>	15,52 $\pm$ 2,81 <sup>b**</sup>	9,60 $\pm$ 2,75 <sup>b***</sup>

\* $p<0.032$ , \*\* $p<0.001$ , \*\*\* $p<0.01$

Karşılaştırmalar: <sup>a</sup> K ve B grupları arasında; <sup>b</sup> B ile B+LA, B+C4S, B+LA+C4S grupları arasında; <sup>c</sup> B+LA+C4S ve diğer dört grup arasında yapılmıştır.



**Şekil 4.4:** Karaciğer, böbrek ve serum MDA değişiklikleri ve LA ile C4S'in etkileri

#### 4.5. Antioksidan Savunmanın Belirlenmesi

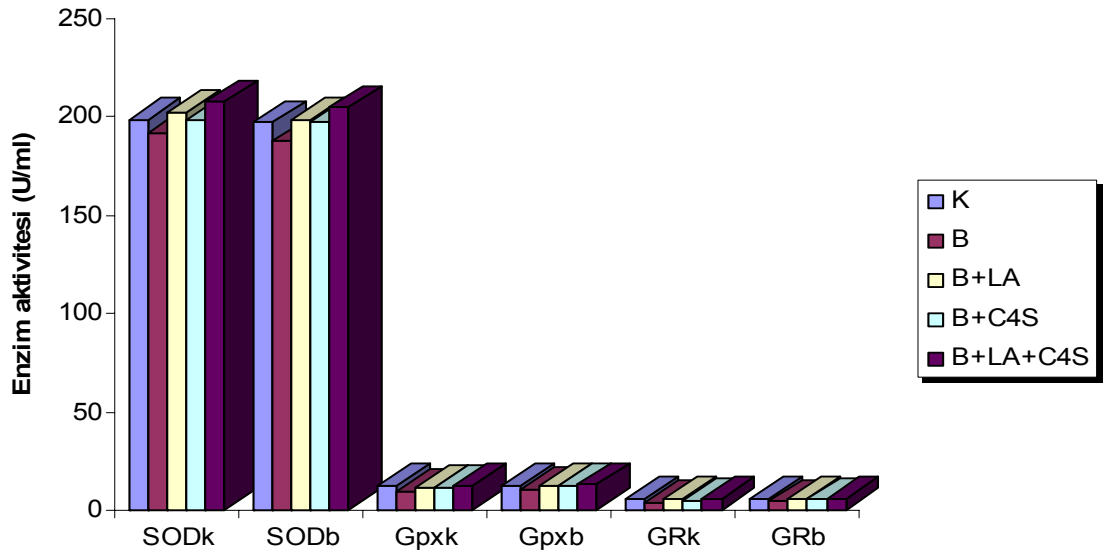
LA ve C4S'in lipit peroksidasyonuna karşı antioksidatif etkilerini belirlemek için, deney süresinin sonunda, kontrol ve deney gruplarına ait karaciğer (SODk, GPxk, GRk ve CATk) ve böbrek (SODb, GPxb, GRb ve CATb) dokularının antioksidan enzim aktiviteleri ölçülmüş, sonuçlar Çizelge 4.6, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında benomil grubunda karaciğer ve böbrekteki tüm enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ( $p < 0,005$ ) saptanmıştır. Benomil+LA, benomil+C4S ve benomil+LA+C4S gruplarının benomil grubu ile kıyaslanmasında ise, üç grupta da anlamlı bir artış ( $p < 0,005$ ) gözlenmiştir. Ayrıca, kontrol ve benomil+LA+C4S grupları karşılaştırıldığında SODk, SODb, CATk ve CATb enzim aktiviteleri, deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış ( $p < 0.005$ ) göstermiştir.

**Çizelge 4.6:** Karaciğer ve böbrek dokularında antioksidan enzim aktiviteleri ile LA ve C4S'in antioksidatif etkileri (Tablodaki tüm değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir).

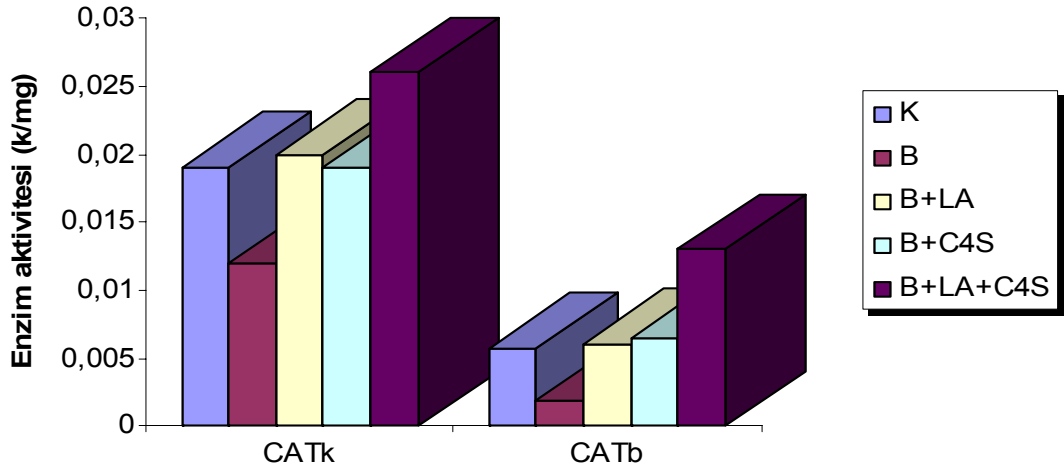
	K (n=10)	B (n=10)	B+LA (n=9)	B+C4S (n=8)	B+LA+C4S (n=6)
<b>SODk (U/ml)</b>	198,04 $\pm$ 1,43	191,98 $\pm$ 1,23 <sup>a*</sup>	201,95 $\pm$ 4,97 <sup>b*</sup>	198,73 $\pm$ 0,85 <sup>b*</sup>	207,33 $\pm$ 2,24 <sup>bc*</sup>
<b>SODb (U/ml)</b>	196,91 $\pm$ 1,54	187,53 $\pm$ 5,91 <sup>a*</sup>	198,41 $\pm$ 0,48 <sup>b*</sup>	197,63 $\pm$ 1,02 <sup>b*</sup>	204,51 $\pm$ 4,51 <sup>bc*</sup>
<b>GPxk (U/ml)</b>	12,24 $\pm$ 0,24	9,87 $\pm$ 0,75 <sup>a*</sup>	11,87 $\pm$ 0,89 <sup>b*</sup>	11,60 $\pm$ 0,84 <sup>b*</sup>	12,60 $\pm$ 0,15 <sup>b*</sup>
<b>GPxb (U/ml)</b>	12,61 $\pm$ 0,33	10,74 $\pm$ 0,83 <sup>a*</sup>	12,62 $\pm$ 0,09 <sup>b*</sup>	12,27 $\pm$ 0,51 <sup>b*</sup>	12,98 $\pm$ 0,33 <sup>bc*</sup>
<b>GRk (U/ml)</b>	5,82 $\pm$ 0,71	4,22 $\pm$ 0,56 <sup>a*</sup>	5,60 $\pm$ 0,42 <sup>b*</sup>	5,23 $\pm$ 0,15 <sup>b*</sup>	6,12 $\pm$ 0,33 <sup>bc*</sup>
<b>GRb (U/ml)</b>	5,67 $\pm$ 0,27	4,54 $\pm$ 0,41 <sup>a*</sup>	5,68 $\pm$ 0,25 <sup>b*</sup>	5,39 $\pm$ 0,25 <sup>b*</sup>	5,88 $\pm$ 0,12 <sup>b*</sup>
<b>CATk (κ/mg)</b>	0,019 $\pm$ 0,001	0,012 $\pm$ 0,002 <sup>a*</sup>	0,02 $\pm$ 0,003 <sup>b*</sup>	0,019 $\pm$ 0,004 <sup>b*</sup>	0,026 $\pm$ 0,001 <sup>bc*</sup>
<b>CATb (κ/mg)</b>	0,005 $\pm$ 0,001	0,001 $\pm$ 0,0007 <sup>a*</sup>	0,006 $\pm$ 0,001 <sup>b*</sup>	0,006 $\pm$ 0,001 <sup>b*</sup>	0,013 $\pm$ 0,002 <sup>bc*</sup>

\*p<0,005

Karşılaştırmalar: <sup>a</sup> K- B grupları arasında; <sup>b</sup> B ile B+LA, B+C4S ve B+LA+C4S grupları arasında; <sup>c</sup> K ile B+LA+C4S grupları arasında yapılmıştır.



**Şekil 4.5:** Karaciğer ve böbrek dokularında antioksidan enzim (SOD, Gpx, GR) aktiviteleri ile LA ve C4S'in antioksidatif etkileri.



**Şekil 4.6:** Karaciğer ve böbrek dokularında antioksidan enzim (CAT) aktiviteleri ile LA ve C4S'in antioksidatif etkileri

#### 4.6. Total Protein Değerleri

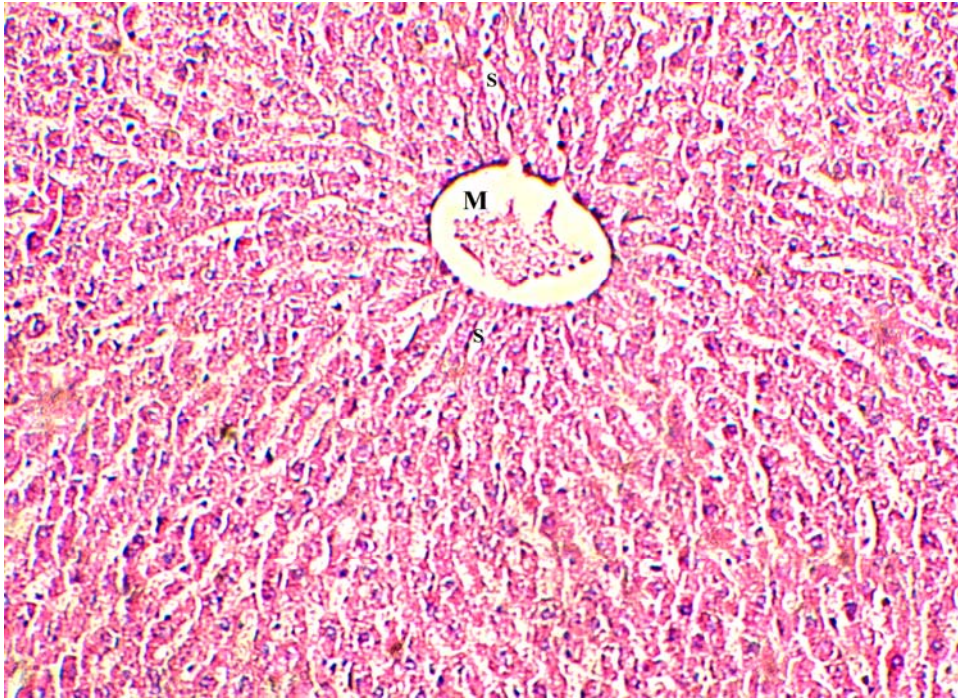
Deney süresinin sonunda bir kontrol ve dört deney grubuna ait total protein miktarları Tablo 4,7'da gösterilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi, tüm gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında total protein miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilememiştir ( $p>0.005$ ).

**Çizelge 4.7:** Karaciğer ve böbrek dokularında total protein miktarları ile LA ve C4S'in etkileri

	K (n=10)	B (n=10)	B+LA (n=9)	B+C4S (n=8)	B+LA+C4S (n=6)
Protein (mg/dl)	0,38 ± 0,044	0,38 ± 0,038	0,37 ± 0,052	0,37 ± 0,040	0,41 ± 0,023

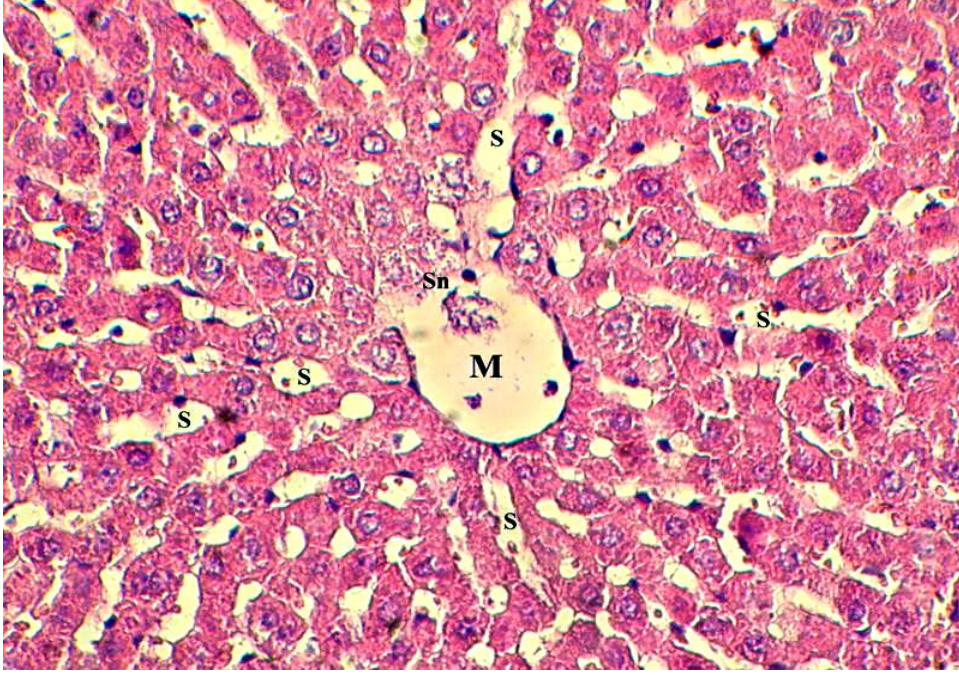
#### 4.7 Histolojik Bulgular

Hematoksilen-Eosin ile boyanmış preparatlarda ışık mikroskobu düzeyinde yapılan incelemelerde karaciğer ve böbrek dokularında gözlenen histolojik değişiklikler Çizelge 4.8’de gösterilmiştir. Kontrol grubu (Şekil 4.7.1.) ile kıyaslandığında, benomil grubuna ait sıçanların karaciğer dokularının genel histolojik yapılarında hasar tespit edilmiştir. Benomil uygulanmış sıçanların karaciğer dokusunda merkezi ven (MV) endotelinde parçalanmalar (sentrilobüler nekroz) ve MV etrafındaki sinüzoidlerde genişlemeler (Şekil 4.7.2), piknotik nükleuslar ve sitoplazmada vakuolizasyon (Şekil 4.7.3) gözlenmiştir. Diğer deney gruplarında (benomil+LA, benomil+C4S, benomil+LA+C4S ) ise karaciğer dokusunun genel histolojik yapısında benomil’in neden olduğu patolojik bulguların kısmen düzeltildiği tespit edilememiştir (Şekil 4.7.4., Şekil 4.7.5., Şekil 4.7.6., Şekil 4.7.7., Şekil 4.7.8. ve Şekil 4.7.9.).

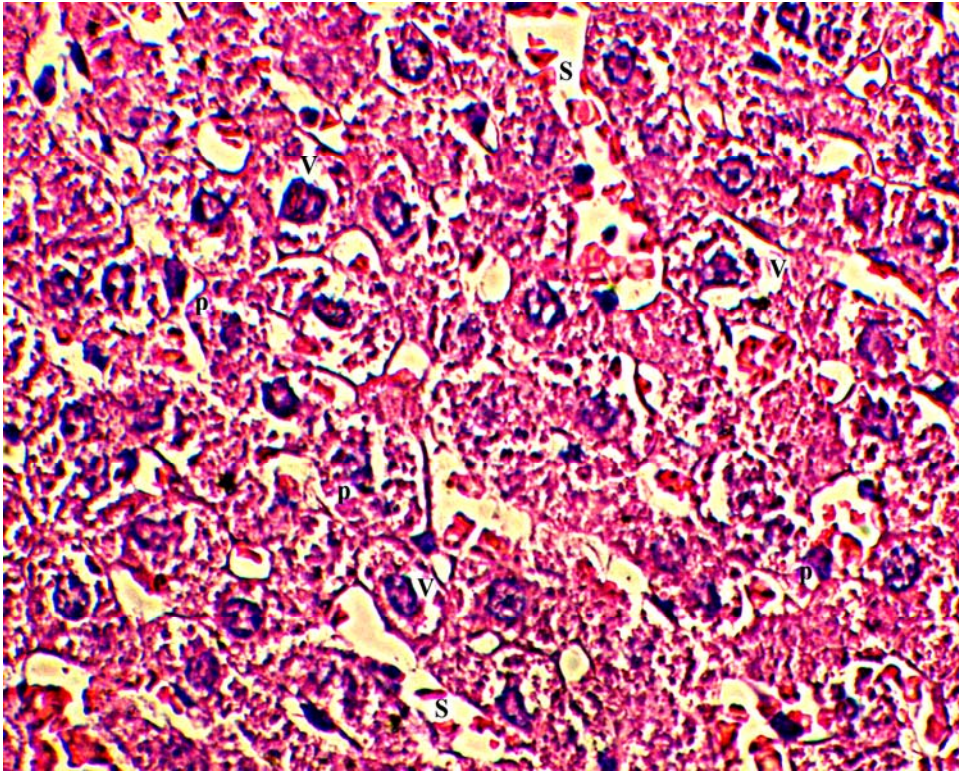


**Şekil 4.7.1.** Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu. M:merkezi ven, S:sinüzoid (100×).



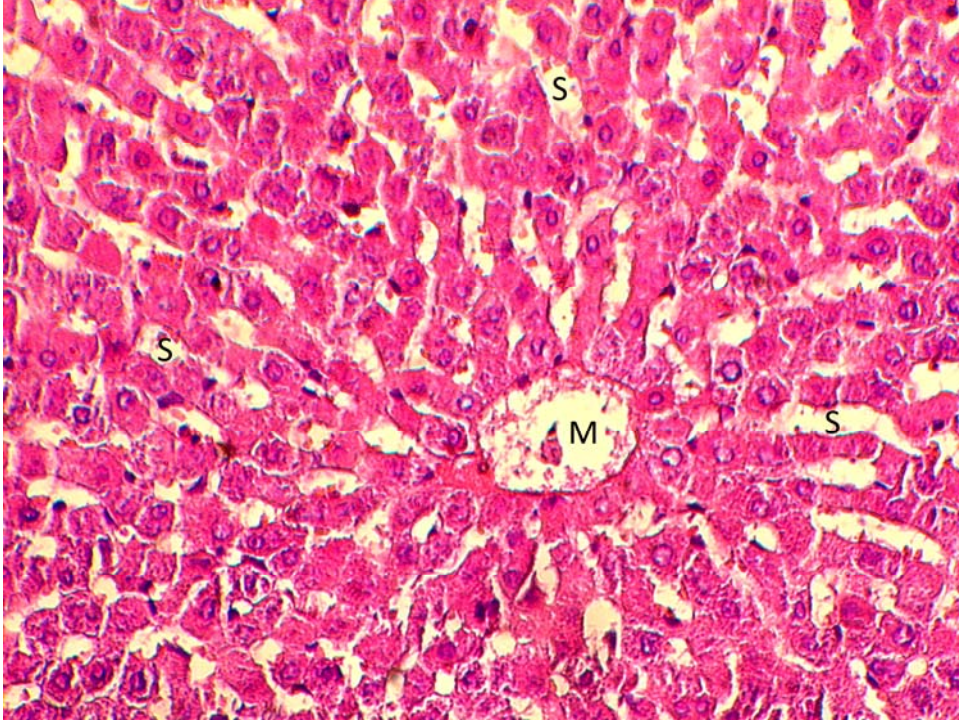


**Şekil 4.7.2.** Benomil grubuna ait karaciğer dokusu. Sn: sentrilobüler nekroz, M:merkezi ven, S: sinüzoidlerde genişleme (200×).

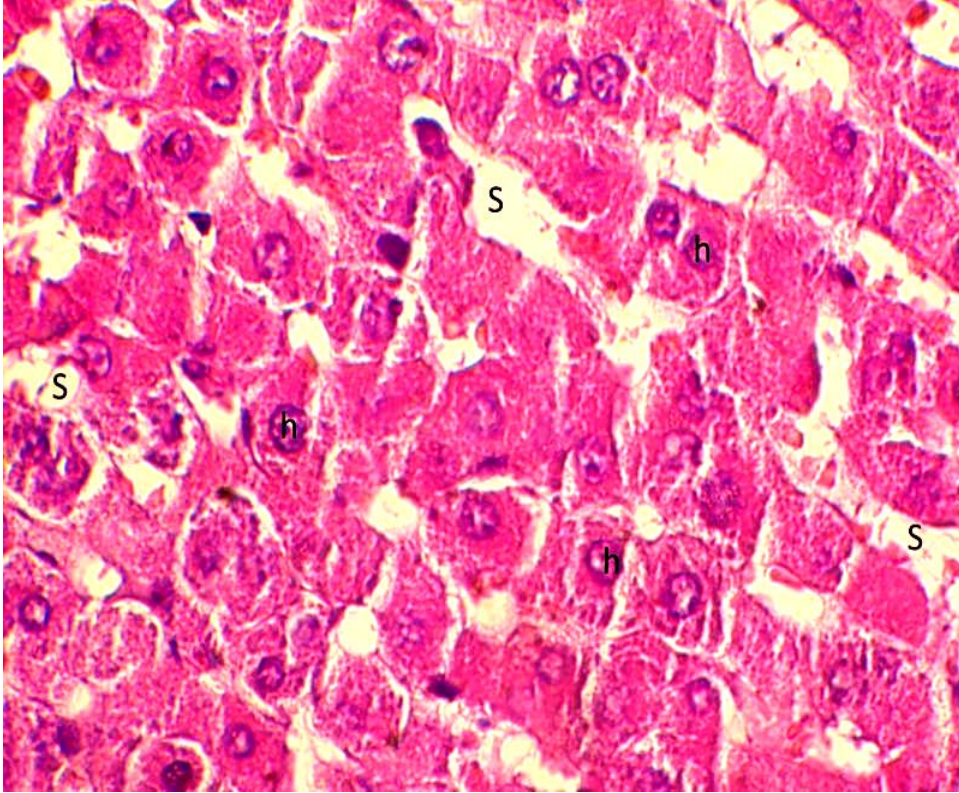


**Şekil 4.7.3.** Benomil grubuna ait karaciğer dokusu. S:sinüzoidlerde genişleme, v:vakuolizasyon, p:piknotik nukleuslar (400×).





**Şekil 4.7.4.** Benomil+LA grubuna ait karaciğer dokusu. M:merkezi ven, S:sinüzoid (200×).

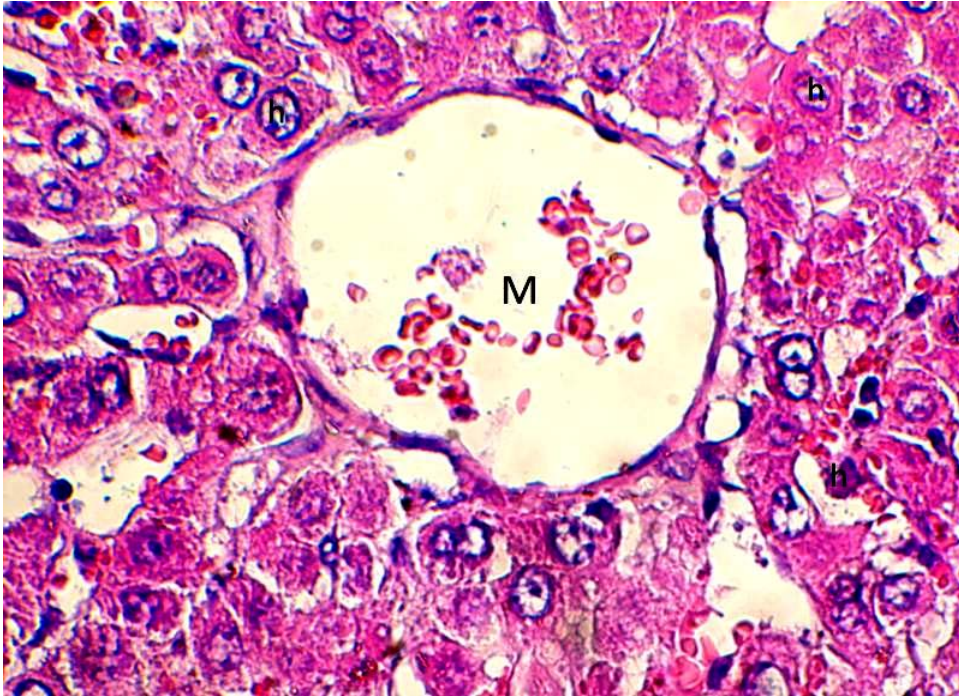


**4.7.5.** Benomil+LA grubuna ait karaciğer dokusu. h:hepatositler, S:sinüzoid (400×).



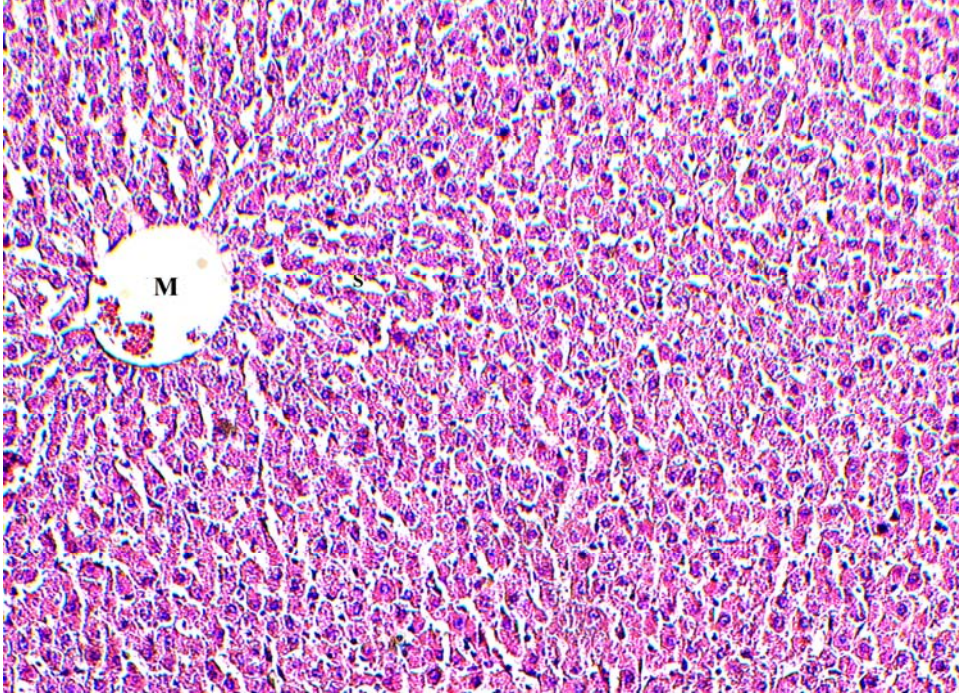


**Şekil 4.7.6.** Benomil+C4S grubuna ait karaciğer dokusu. M:merkezi ven, S:sinüzoid (100×).

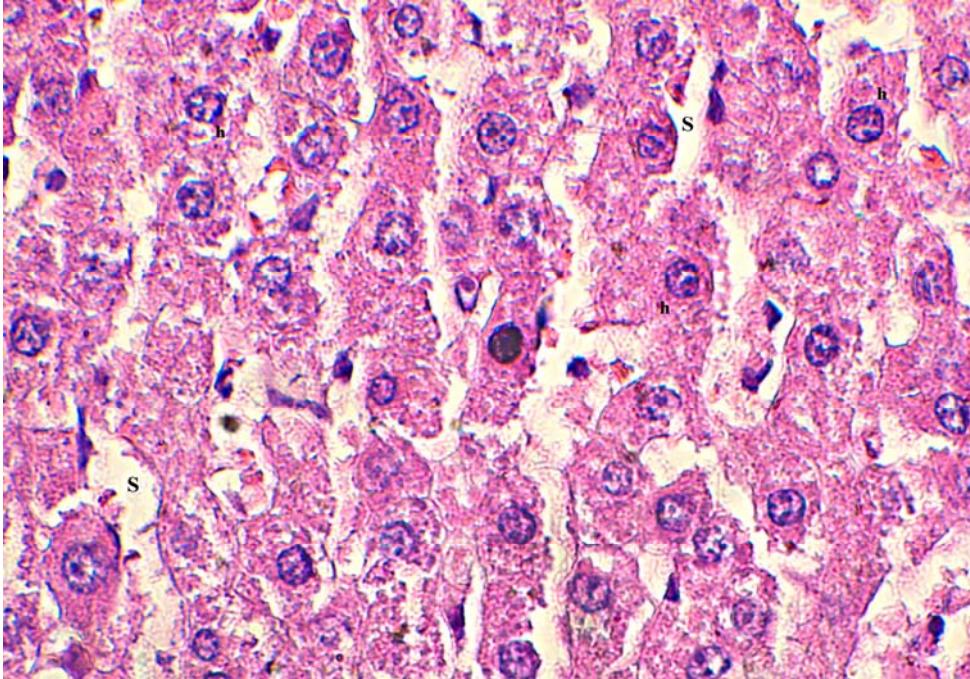


**Şekil 4.7.7.** Benomil+C4S grubuna ait karaciğer dokusu. M: merkezi ven h:hepatositler (400×).





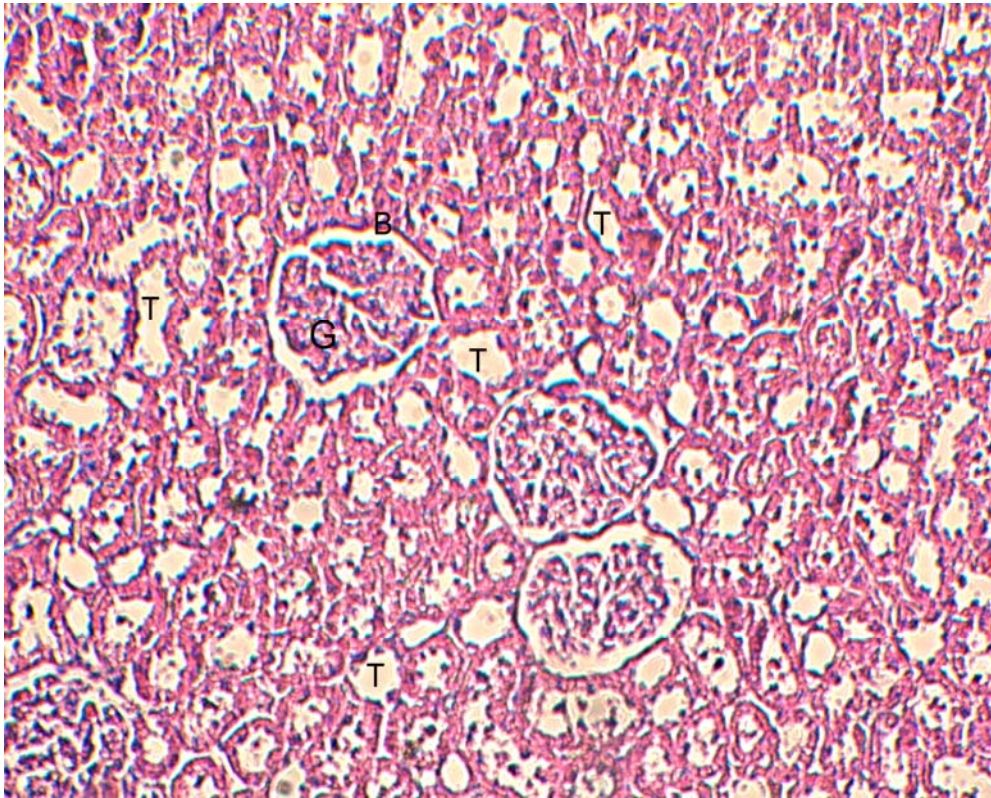
**Şekil 4.7.8.** Benomil+LA+C4S grubuna ait karaciğer dokusu. M:merkezi ven, S:sinüzoid (100×).



**Şekil 4.7.9.** Benomil+LA+C4S grubuna ait karaciğer dokusu. h:hepatositler, S:sinüzoid (400×).

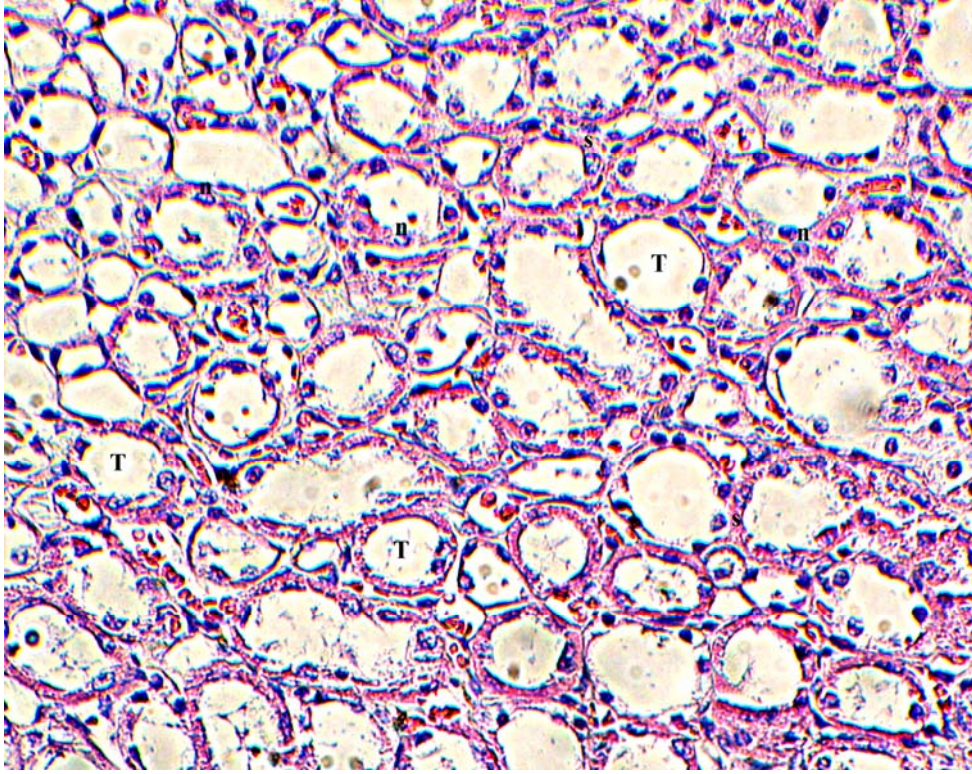


Böbrek dokusunda yapılan ışık mikroskobu incelemeleri sonucunda, kontrol grubuna göre benomil grubuna ait sıçanlarda genel histolojik yapıda (Şekil 4.7.10. ve Şekil 4.7.11.) hasar gözlenmiştir. Sıçanların böbrek dokusunda benomil toksisitesine bağlı olarak meydana gelen hasarlar; korteks bölgesinde tubular dejenerasyon, sitoplazmik vakuolizasyon, bozulmuş tubul epitelyum hücrelerinde piknotik nukleuslar (Şekil 4.7.12.), tubul lümeninde sitoplazma parçaları, nukleus parçaları ve nekrotik tubulde bazal membran kayıpları (Şekil 4.7.13.) olarak sıralanabilir. Benomil+LA, benomil+C4S, benomil+LA+C4S gruplarına ait böbrek dokularında ise genel histolojik yapıya kısmen uygunluk gösteren bulgular elde edilmiştir (Şekil 4.7.14, Şekil 4.7.15. ve Şekil 4.7.16.). Bununla birlikte, B+LA ve B+C4S gruplarına ait bazı kesitlerde birkaç piknotik nukleus görülmüştür.

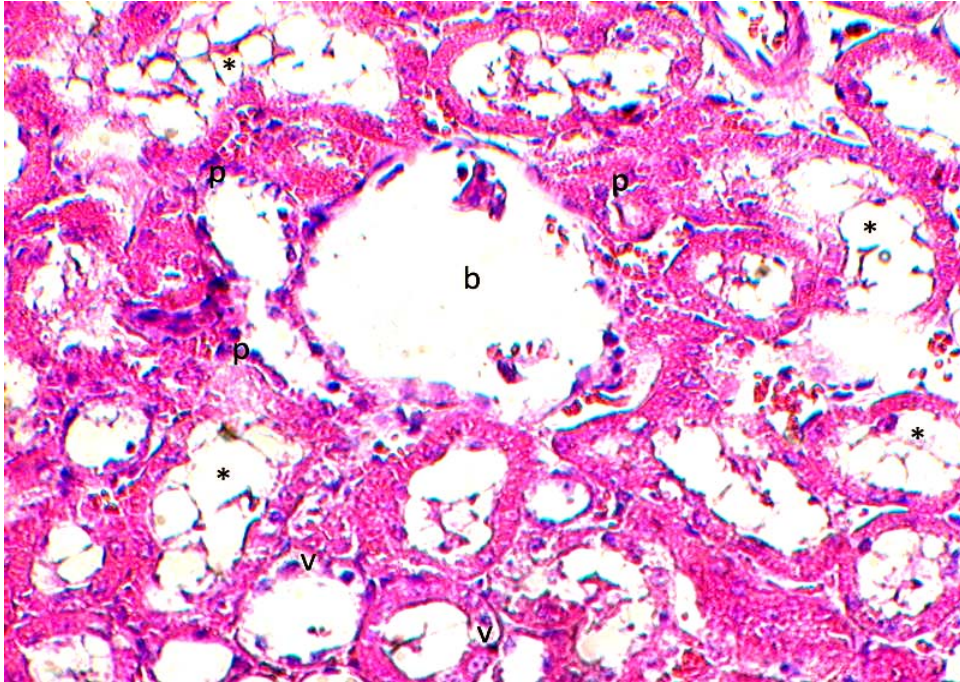


**Şekil 4.7.10.** Kontrol grubuna ait böbrek dokusu (Korteks). G:glomerulus, B:bowman kapsülü, T:tubul



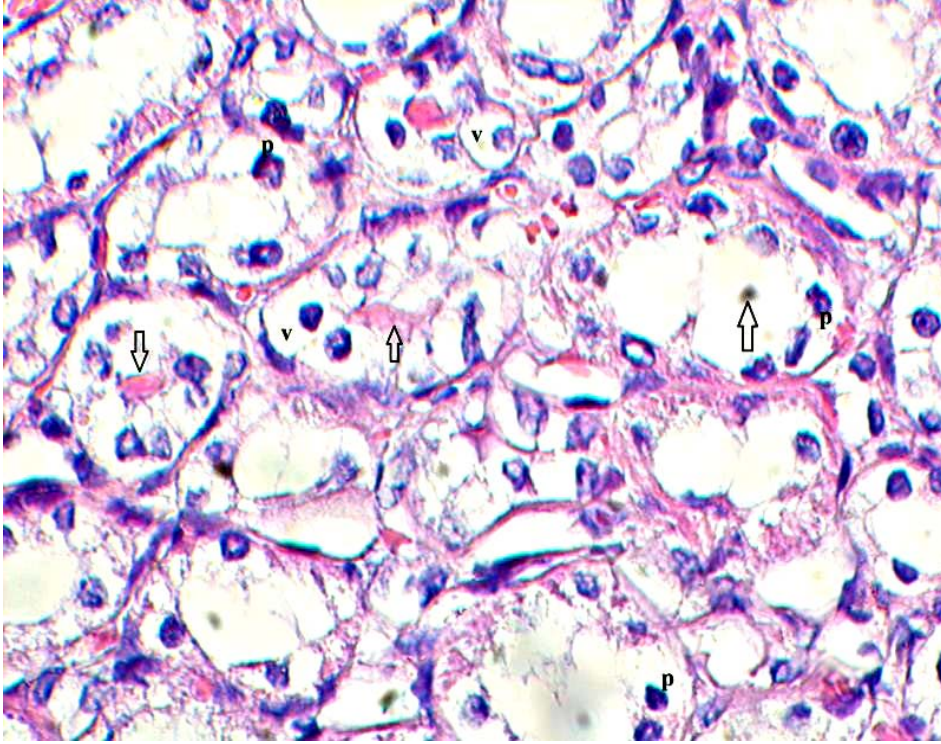


**Şekil 4.7.11.** Kontrol grubuna ait böbrek dokusu (Medulla). T:tubul, n:nukleus, s:sitoplazma (200×).

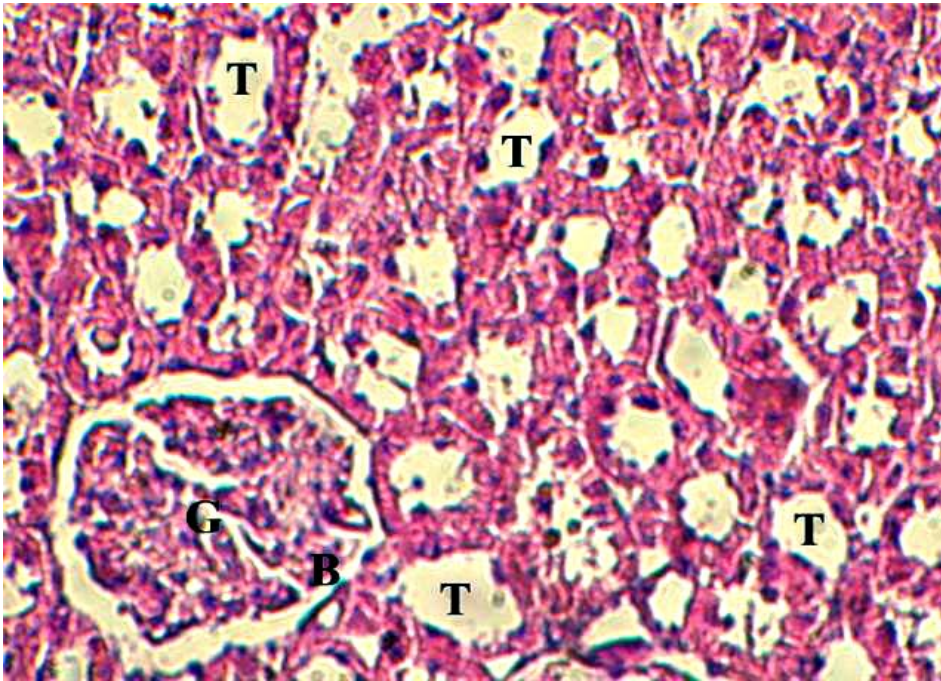


**Şekil 4.7.12.** Benomil grubuna ait böbrek dokusu. \*:korteks bölgesinde tubular dejenerasyonlar, p:piknotik nukleus, v:sitoplazmik vakuolizasyon, b: Bowman kapsülünde glomerular kayıp (200×).



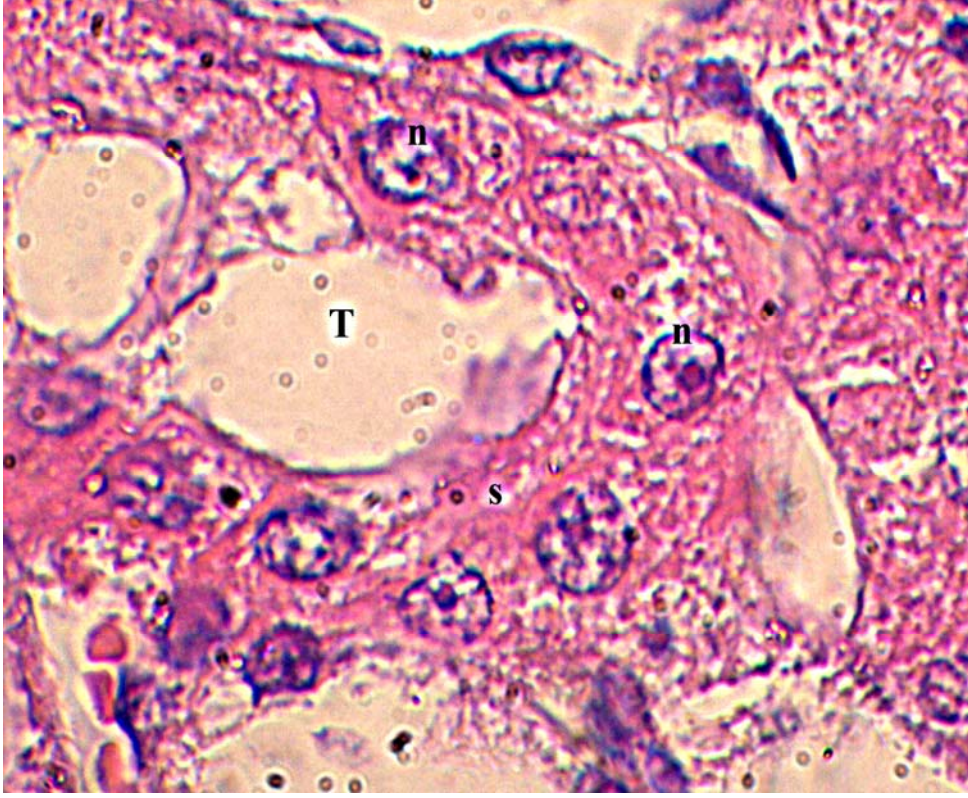


**Şekil 4.7.13.** Benomil grubuna ait böbrek dokusu.  $\Rightarrow$  : tubul lümeninde sitoplazma ve nukleus parçaları p:piknotik nukleus, v:sitoplazmik vakuolizasyon (400×).

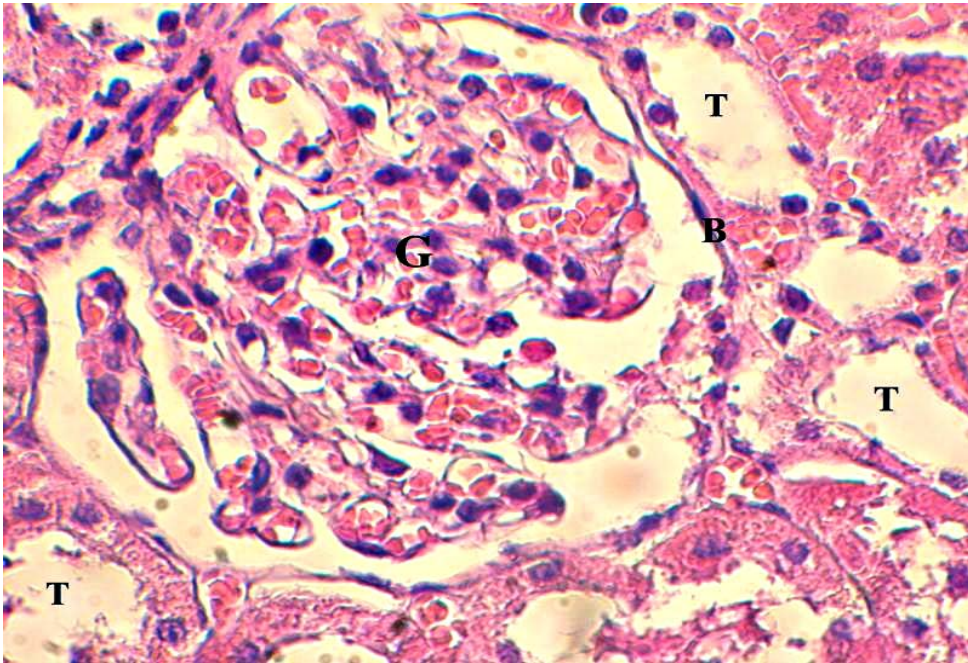


**Şekil 4.7.14.** Benomil+LA grubuna ait böbrek dokusu. G:glomerulus, B:bowman kapsülü, T:tubul (200×).





**Şekil 4.7.15.** Benomil+C4S grubua ait böbrek dokusu. T:tubul, n:nukleus, s:sitoplazma (1000×).



**Şekil 4.7.16.** Benomil+LA+C4S grubuna ait böbrek dokusu. G:glomerulus, B:bowman kapsülü, T:tubul (400×).

**Çizelge 4.8:** Karaciğer ve böbrek dokularında Benomile bağlı histolojik değişiklikler ile LA ve C4S'in etkileri

Histolojik değişim	Deney Grupları				
	K	B	B+LA	B+C4S	B+LA+C4S
<b>Karaciğer</b>					
Sinüzoidlerde genişleme	– (10/10)	+++ (10/10)	– (9/9)	+(2/8)	– (6/6)
MV. endotelinde parçalanma	– (10/10)	+ (7/10)	– (9/9)	– (9/8)	– (6/6)
Piknotik nukleus	– (10/10)	+++ (9/10)	– (9/9)	– (9/8)	– (6/6)
Vakuolizasyon	– (10/10)	+++ (8/10)	– (9/9)	+(1/8)	– (6/6)
<b>Böbrek</b>					
Tubular dejenerasyon	– (10/10)	++ (9/10)	– (9/9)	– (8/8)	– (6/6)
Sitoplazmik vakuolizasyon	– (10/10)	+++ (9/10)	– (9/9)	– (8/8)	– (6/6)
Piknotik nukleuslar	– (10/10)	+++ (9/10)	+(1/9)	+(1/8)	– (6/6)
Bazal membran kayıpları	– (10/10)	+ (8/10)	– (9/9)	– (8/8)	– (6/6)

(–) tüm görüntü alanlarında değişim bulunamadı, (+) tüm görüntü alanlarının %25 den daha az alanda histolojik değişim, (++) tüm görüntü alanlarının %25-%75'i arasındaki alanda histolojik değişim, (+++) tüm görüntü alanlarının %75'inden daha fazla alanda histolojik değişim.

## 5. TARTIŞMA

Pestisitler, insanlar tarafından tarımsal alanlarda daha fazla ve kaliteli ürün elde etmek için tarım zararlıları ile mücadelede kullanılan kimyasal maddelerdir. Fakat bu kimyasal maddeler besin zinciri yolu ile insana ulaşmakta ve toksik etkilere neden olmaktadır. Son yıllarda bu toksik etkilerin neler olduğu ve daha da önemlisi bu toksik etkilerin nasıl azaltılabileceği veya nasıl ortadan kaldırılabilceği araştırmacılar için büyük önem kazanmıştır.

Çeşitli yollarla organizmaya giren kimyasal maddelerin (ksenobiyotik) toksik etkilerinin belirlenmesi için çeşitli testler yapılmaktadır. Bu testler çeşitli parametreler ölçülerek yapılabilmektedir. Bu parametrelerden bazıları; vücut ağırlığı ve organ ağırlığındaki değişikliklerin incelenmesi, kan değerlerinin incelenmesi ve karaciğer toksisitesinin belirlenmesi şeklinde sıralanabilir. Hepatotoksitenin belirlenmesindeki temel parametrelerden biri, bazı önemli klinik enzimlerin serum düzeylerinin ölçülmesidir. Bunun yanı sıra, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunun gerçekleştiği karaciğer ve böbrek dokularının histopatolojik olarak incelenmesi de önemli bir parametredir.

Ksenobiyotiklerin toksik etkilerinin belirlenmesindeki bir diğer parametre, bu maddelerin organizmada oksidatif stres oluşturabilme yeteneklerinin belirlenmesidir. Ksenobiyotiklerin organizma içinde oksidan olarak görev aldığı bilinmektedir (Pacifci ve Davies, 1991). Oksidanların organizmada oluşturdukları hasarlardan biri de hücrelerde oksidatif strese neden olmalarıdır. Hücrelerde oksidatif stres oluşumunun belirlenmesindeki temel parametrelerden biri lipid peroksidasyon ürünü olarak meydana gelen malondialdehid düzeylerinin ölçülmesidir. MDA miktarlarındaki artış oksidatif stresin oluştuğunu işaret eder (Banks ve Solkiman 1997).

Hücrelerde oluşan oksidatif strese karşı organizmalar antioksidanlar adı verilen bir grup molekül ile savunma yapanlar. Hücrelerde bulunan antioksidanların bazıları hücre içi enzimlerdir (SOD, CAT, GR ve Gpx). Bu enzimlerin aktivitelerindeki

değişiklikler oksidatif hasar belirlenmesindeki bir diğer önemli parametredir. Organizmaların oksidatif savunma mekanizmalarını ekzojen kaynaklı antioksidanlar ile de destekleyebilecekleri günümüzde giderek önem kazanan bir konu olmaktadır. Özellikle bitkisel kaynaklı bazı maddelerin kuvvetli antioksidan özelliklerini gösteren çalışmalar hızla artmaktadır (Gülcü vd. 2008, Ayaz ve Alpsoy 2007).

Bu konudan hareketle bu çalışmada, Trakya yöresinde de çeltik üretiminde yaygın bir şekilde kullanılan fungusit, benomile bağlı olarak sıçanlarda oluşan subkronik oksidatif strese karşı LA ve C4S gibi önemi hızla artan iki antioksidanın tek tek ve birlikte uygulanmaları sonucunda karaciğer ve böbrek dokuları üzerinde oluşturabileceği antioksidatif etkilerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Benomile bağlı subkronik hasarların ve bu hasarlara karşı LA ve C4S'in koruyucu etkilerinin araştırıldığı çalışmada, ilk olarak vücut ağırlığı üzerindeki değişiklikler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre vücut ağırlıklarında benomile bağlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. Cummings ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiştir. 6 farklı benomil (25, 50, 100, 200, 400 ve 1000 mg/kg.gün) dozu dişi sıçanların hamileliklerinin 1–8. günlerinde gavaj yolu ile uygulanmıştır. Deney sonunda en yüksek benomil dozu olan 1000 mg/kg.gün'lük doz sıçanların vücut ağırlığında önemli bir azalışa neden olmuştur. Fakat diğer dozlarda vücut ağırlığı bakımından önemli bir değişiklik tespit edilememiştir (Cummings vd. 1990). Benomil toksisitesinin araştırıldığı diğer bir diğer çalışmada, dişi ve erkek sıçanlara 5 gün boyunca 200 mg/kg'lık dozlarda benomil gavaj yolu ile uygulanmış ve deney sonunda vücut ağırlığında herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır (Balkan ve Aktaş, 2005). Başka bir çalışmada ise, benomil metaboliti olan karbendazim 15 hafta boyunca her gün 150, 300 ve 600 mg/kg oral yolla sıçanlara verilmiştir ve deney süresini sonunda vücut ağırlığında önemli bir değişim olmadığı sonucuna varılmıştır (Barlas vd. 2002). Yine, Benomil'in metaboliti olan karbendazim (25 mg/kg(v.a/gün))'in oral yolla erkek sıçanlara uygulandığı bir çalışmanın sonucunda vücut ağırlığında bir değişim olmadığı sonucuna varılmıştır (Rajeswary vd. 2007).



5 hafta süre ile haftada bir kez 200 mg/kg olarak uygulanan Benomil'in hayvanların vücut ağırlıklarında önemli bir değişiklik oluşturmamasına karşılık, LA ve C4S gerek tek başlarına gerekse birlikte uygulandıklarında vücut ağırlıkları önemli düzeyde artış göstermektedir. Maritim ve diğerlerinin sıçanlarda  $\alpha$ -lipoik asidin streptozotosinin neden olduğu oksidatif strese karşı koruyucu etkilerinin incelendiği bir çalışmada, kontrol, kontrol+10mg/kg LA, kontrol+50mg/kg LA, diyabet ve diyabet+10mg/kg LA grupları yer almaktadır.  $\alpha$ -lipoik asidin vücut ağırlığına etkileri incelendiğinde ilk üç grup arasında önemli bir değişim olmadığı ancak diyabetik sıçanlara ait her iki grupta da kontrol gurubuna göre vücut ağırlığında önemli bir azalış olduğu saptanmıştır (Maritim vd., 2003). Bu sonuçlar çalışmamızda elde edilen sonuçlara uymamaktadır. Bu farklılığın nedeni; yapılan çalışmanın uygulama süresinin (14 gün) bizim çalışmamızın uygulama süresine (5 hafta) göre oldukça kısa olmasına bağlı olabilir. Çalışmamızda tespit ettiğimiz bu sonuçlara göre, LA ve C4S'in dışardan alındığında metabolizma üzerinde olumlu etkiler göstereceği söylenebilir.

Bu çalışmada, subkronik benomil ve LA, C4S uygulaması sonrasında, karaciğer ve böbrek dokularının ağırlıklarında herhangi bir değişim görülmemiştir. Bu sonuçlar Shukla vd. (1989), Selmanoğlu vd, (2001) nin farelerde uzun süreli benomil uygulaması ile elde ettikleri sonuçlara paraleldir. Shukla vd. nin (1989) farelerle yaptığı çalışmada 1000 ppm ve 4000 ppm benomil 15 gün boyunca her gün farelere uygulanmış ve deney sonunda her iki dozda da karaciğer ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığı tespit edilmiştir. Diğer çalışmada da (Selmanoğlu vd, 2001), benomil metaboliti olan karbendazim 15 hafta boyunca her gün 150, 300 ve 600 mg/kg oral yolla sıçanlara verilmiş ve bu hayvanların hem karaciğer hem de böbrek ağırlıklarında değişim olmadığı bulunmuştur. Benomil'in organ ağırlıkları üzerine etkilerinin araştırıldığı diğer bir çalışmada ise (Balkan ve Aktaş, 2005) benzer olmayan sonuçlar elde edilmiştir. Dişi ve erkek sıçanlara 5 gün boyunca 200 mg/kg'lık dozlarda benomilin gavaj yolu ile uygulandığı bu çalışmada sonuç olarak; erkek ve dişi sıçanlarda karaciğer ağırlığında artışa karşılık, böbrek ağırlıklarında önemli bir değişim meydana gelmediği bildirilmiştir. Bu farklılıklar muhtemelen kısa süreli beslenmeye ve uygulanış şekline bağlı olabilir.

Subkronik benomil ve LA, C4S uygulaması sonrasında, testis ağırlıklarında benomile bağlı önemli bir azalma tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Daha önce yaptığımız çalışmada (Balkan ve Aktaç, 2005) testis ağırlığında herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bu farklılık benomil'in 5 günlük kısa süreli uygulamasına ve uygulama şekline bağlı olabilir. Bir başka çalışmada ise, karbendezim (25 mg/kg(v.a/gün)) oral yolla erkek sıçanlara uygulanmış ve testis ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit etmişlerdir (Rajeswary vd. 2007). Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamız ile benzer niteliktedir. Ayrıca, bu çalışmada, diğer çalışmalarda incelenmeyen kalp ağırlıkları da ölçülmüş ve tüm gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişim bulunamamıştır.

Çalışmamızda benomil dalak ve testis ağırlıklarında önemli azalmaya neden olmuştur. Bu organlardan sadece testislerde LA ve C4S uygulamaları sonucunda önemli bir ağırlık artışı olmuştur. Dalakta önemli bir değişiklik görülmemiştir. Bu sonuç, iki antioksidan maddenin testis metabolizmasında olumlu etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Günümüzde, klinik enzimlerin serum değerlerindeki değişiklikler çeşitli hastalıkların tanısında kullanılan önemli bir parametredir. Özellikle, karaciğer, kalp, kas ve hematolojik hastalıkların tanısında enzim değerlerinin ölçümleri yaygın olarak kullanılır (Onat vd. 1995). Karaciğer hasarlarında bazı enzimlerin serum içindeki değerleri artmaktadır. Çünkü bu enzimlerin safra ile kompleks yapmaları engellenmektedir (Gözükara E. 2001). Klinik enzimler arasında en önemli olanları aminotransferazlar (AST ve ALT), laktat dehidrogenaz (LDH) ve gamma glutamil transferaz (GGT)'dir.

Aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) kalp ve karaciğer hasarlarında, LDH hasar görmüş dokularda (Dere ve Polat 2001) ve GGT doku tümörlerinde (özellikle hepatoselüler tümörlerde) serumda anormal yüksek düzeylerde gözlenmiştir (Shukla vd. 1989).

Igbedioh ve Akinyele (1992) 7 gün süreyle 520, 560 ve 600 mg/kg.gün'lık benomil uygulanmış sıçanlarda AST ve ALT miktarlarında artış tespit etmişlerdir. Benomil metaboliti olan karbendazim ile yapılan bir çalışmada, 15 hafta boyunca her gün 150, 300 ve 600 mg/kg karbendazim uygulanmış sıçanlarda serum AST ve ALT düzeylerinde önemli bir değişim gözlenmemiştir (Selmanoğlu vd. 2001).

Sıçanlarla yapılan bir çalışmada oral yolla uygulanan asetaminofen'in (APAP-2.5 g/kg) neden olduğu hepatik ve renal hasara karşı LA'nın (100 mg/kg) koruyucu rolü araştırılmıştır ve deney sonucunda APAP'ın sıçanlarda AST ve ALT düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığını buna karşın APAP ile birlikte uygulanan LA'nın hem AST hem de ALT düzeyini düşürdüğü bulunmuştur (Abdel-Zahaer vd. 2008). Her iki çalışmada da sıçanlara uygulanan toksik maddelerin neden olduğu AST ve ALT düzeylerindeki değişim LA uygulanması ile normal düzeylere geri döndürülebildiği kanıtlanmıştır.

Campo vd. (2004), sıçanlarda karbon tetraklorit'in ( $\text{CCl}_4$ -2.0 ml/kg) neden olduğu karaciğer fibrogenezine karşı hiyalüorik asit (HYA) ve kondroitin-4-sülfat (C4S) etkilerini 6 hafta boyunca yapılan deneylerle araştırılmışlardır. Kontrol ve deney gruplarında [ $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CCl}_4$ +HYA (25mg/kg),  $\text{CCl}_4$ +C4S (25 mg/kg),  $\text{CCl}_4$ +HYA+C4S (12,5+12,5 mg/kg)] AST ve ALT düzeyleri incelendiğinde,  $\text{CCl}_4$  grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bununla birlikte,  $\text{CCl}_4$ +HYA,  $\text{CCl}_4$ +C4S, grupları  $\text{CCl}_4$  grubu ile karşılaştırıldığında AST ve ALT düzeylerinde anlamlı bir azalış (özellikle  $\text{CCl}_4$ +HYA+C4S grubunda bu azalış daha fazla) tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda da sıçanlarda  $\text{CCl}_4$ 'nin karaciğer hasarına neden olduğu aynı zamanda HYA ve C4S'in  $\text{CCl}_4$  ile birlikte uygulanması ile karaciğer hasarının azaltılabildiği bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızın sonuçları da, Igbedioh ve Akinyele (1992); Campo vd. (2004) ve Abdel-Zahaer vd.'nin (2008) yapmış oldukları çalışmaların sonuçlarına benzerdir. Çalışmamızda, subkronik benomil uygulamasına bağlı olarak AST, ALT ve LDH düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur. LA ve C4S'in benomille birlikte uygulandığı gruplarda ise, bu değerler önemli olarak azalmaktadır. Özellikle LA ve C4S

birlikte uygulanması AST ve ALT enzim değerlerini kontroldekinden daha alt düzeye indirmiştir.

Serum GGT düzeyleri incelendiğinde, anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu bulgu, Terse vd. (1993) ile Balkan ve Aktaş'ın (2005) yapmış oldukları çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir. Terse ve diğerleri, 15 gün süreyle benomil (4000 ppm) ile beslenmiş piliçlerde serum GGT düzeyinin değişmediği ve bu dozdaki benomil'in hepatotoksik olmadığı açıklanmıştır. Balkan ve Aktaş da, kısa süreli benomil uygulamasının GGT düzeylerinde değişikliğe neden olmadığını göstermişlerdir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre; AST, ALT ve LDH aktivitelerinin benomil grubundaki artışı benomil'in karaciğer ve böbrek dokularında hasara neden olduğunun bir işaretidir. Yine enzim aktivitelerinin benomil grubuna karşı B+LA, B+C4S, B+LA+C4S gruplarındaki azalışı ise LA ve C4S'nin benomil'in neden olduğu doku hasarına karşı koruyucu etkilere sahip olduğunun bir göstergesidir. GGT enzim aktivitesinde ise, benomil grubunda diğer gruplara göre bir değişim olmaması benomil'in hepatokarsinojenik olmadığını işaret eder.

Oksidanlar ilk olarak membranda bol miktarda bulunan lipidleri etkileyerek lipid peroksidasyonunu (LPO) başlatırlar. LPO'nunu oluşturan reaksiyonlar bir zincir reaksiyonudur. Zincir kırıcı bir etki veya iki lipid peroksidinin birbiri ile etkileşmesi olmadıkça giderek artan bir şekilde devam etmektedir. LPO'nun ilk basamağında konjuge dien, zincirin ilerleme safhasında lipit hidroperoksit ve sonlanma basamağında da MDA gibi reaktif aldehidler açığa çıkar (Yapar, 2006). Bu aldehidin miktarının çeşitli yöntemler kullanılarak ölçülmesi LPO'nun varlığının incelenmesinde temel parametredir.

Sıçanlarda 7 gün boyunca oral yolla uygulanan benomil'in (200 mg/kg.gün) neden olduğu LPO'ya karşı 21-aminosteroid (U74389G-15 mg/kg) ve DPPD (15 mg/kg) antioksidanların koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada hidroperoksit düzeyleri ölçülmüştür. Çalışmanın sonucunda benomil'in hidroperoksit düzeylerini arttırdığı ve benomil ile birlikte uygulanan her iki antioksidanın hidroperoksit değerlerini azaltarak koruyucu etki yaptığı belirtilmiştir (Banks ve Solkiman 1997).

LA'nın oksidatif strese karşı koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, sıçanlarda toksik etkiye neden olan sisplatin (16 mg/kg, ip) ve sisplatinle birlikte üç farklı dozda LA (sisplatin+25 mg/kg, sisplatin+50 mg/kg, sisplatin+100 mg/kg) uygulanmış ve uygulama sonrası hayvanların kohlealarında MDA değerleri ölçülmüştür. Çalışmada kontrol grubu ile deney grupları karşılaştırılmış ve sisplatin'in toksik etkisi ile MDA değerlerini arttırdığı, LA'nın da antioksidan özellik göstererek uygulama dozunun artışına paralel olarak MDA değerlerini azalttığı belirtilmiştir. (Rybak vd. 1998). Diğer bir çalışma da ise, sıçanlara 21 gün oral yolla siklosporin -A (CsA-25 mg/kg v.a), LA (20 mg/kg v.a), ve CsA (25 mg/kg v.a)+ LA (20 mg/kg v.a) uygulanmış ve MDA ölçümleri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak CsA'nın LPO'ya neden olduğu, CsA+LA uygulanması ile de LPO'nun azaltılabildiği MDA değerlerine ölçümleri değerlendirilerek ispatlanmıştır (Amudha vd. 2007). Manda vd. (2007) farelerde karaciğer, böbrek, dalak, testis ve beyinde x ışınlarının (4Gy-6Gy) neden olduğu oksidatif stresin LA (200 mg/kg) (4 Gy+LA, 6Gy+LA) uygulaması ile önlenip önlenmediğini belirlemek için kontrol ve deney gruplarında MDA değerlerini ölçmüşlerdir. Çalışmada yer alan tüm dokularda x-ışınlarına maruz kalan hayvanların MDA değerlerinin arttığı ve LA uygulanması ile de MDA değerlerinin önemli ölçüde azaltılabildiği sonucuna varılmıştır. Toklu vd.'nin (2009) LA'nın beyindeki koruyucu etkisini araştırdığı bir diğer çalışmada ise travmatik beyin hasarı ile artan MDA değerlerinin LA (travma+LA(100 mg/kg)) uygulanması ile azaltılabildiği rapor edilmiştir. Tüm bu çalışmalarda da görüldüğü gibi çeşitli dokularda meydana gelen oksidatif stres sonucu artan MDA değerleri LA uygulamaları ile düşürülmektedir. MDA değerlerindeki bu azalış LA'nın antioksidan özellik gösterdiğinin bir kanıtıdır.

Bizim çalışmamızda da yukarıda bahsedilen çalışmalara (Banks ve Solkiman 1997, Rybak vd. 1999, Amudha vd. 2007, Manda vd. 2007, Toklu vd. 2009) paralel olarak; 5 hafta süreyle haftada bir kez benomil (200 mg/kg) uygulanan sıçanların kontrol grubundakilere göre karaciğer, böbrek ve serum MDA değerlerinde anlamlı bir artış saptanmıştır. B+LA, B+C4S ve B+LA+C4S gruplarındaki hayvanların böbrek ve serum MDA değerleri benomil grubu ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir azalış, B+LA+C4S grubundaki serum MDA değeri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında da anlamlı bir azalış

tespit edilmiştir. Bu bulgular ışığı altında benomil'in karaciğer, böbrek ve serumda LPO'ya neden olduğu, LA ve C4S uygulamalarının ise LPO'yu azalttığı söylenebilir.

Ksenobiyotiklerin hücrelerde meydana getirdikleri toksik etkiler sonucu meydana gelen oksidatif hasarların ve bu hasarlara karşı antioksidan maddelerin koruyucu etkilerinin belirlenmesi için antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimlerin incelenmesi büyük bir önem taşımaktadır.

Sivaprasad ve ark. (2004), LA ( $25 \text{ mg kg}^{-1}\text{v.a. gün}^{-1}\text{ip}$ ) ve 2,3-dimerkaptosüksinik asit'in (DMSA,  $20 \text{ mg kg}^{-1}\text{v.a. gün}^{-1}\text{ip}$ ) ve kurşunun ( $\text{Pb-}\%0.2$ ) sıçan karaciğerlerinde neden olduğu lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada SOD, CAT ve Gpx gibi, antioksidan enzim aktiviteleri incelenmiş ve sonuç olarak Pb uygulanan hayvanlarda üç enzim aktivitesinde de azalış, Pb ile birlikte LA ve DMSA uygulanan hayvanlarda ise üç enzimde de anlamlı bir artış tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar ışığı altında LA ve DMSA'nın oksidatif strese karşı koruyucu etkileri olduğu belirtilmiştir. Diğer bir çalışmada, sıçanlarda karbon tetraklorür'ün ( $\text{CCl}_4\text{-}2.0 \text{ ml/kg}$ ) neden olduğu karaciğer fibrogenezine karşı hiyalüronik asit (HYA) ve kondroitin-4-sülfat'ın (C4S) antioksidan etkileri 6 hafta boyunca araştırılmıştır (Campo vd. 2004). Çalışmada; sıçanlar kontrol,  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CCl}_4\text{+HYA}$  ( $25 \text{ mg/kg}$ ),  $\text{CCl}_4\text{+C4S}$  ( $25 \text{ mg/kg}$ ) ve  $\text{CCl}_4\text{+HYA+C4S}$  ( $12.5 \text{ mg/kg}+12.5 \text{ mg/kg}$ ) grupları olmak üzere 5 farklı grubu ayrılmışlardır.  $\text{CCl}_4$  grubunda SOD ve Gpx enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalış,  $\text{CCl}_4\text{+HYA}$ ,  $\text{CCl}_4\text{+C4S}$  ve  $\text{CCl}_4\text{+HYA+C4S}$  gruplarında ise  $\text{CCl}_4$  grubuna göre anlamlı bir artış tespit edilmiş ve HYA ve C4S'nin oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızın sonuçları da Sivaprasad vd. (2004) ve Campo vd. (2004)'nin sonuçları ile paralellik göstermektedir. Hem karaciğer hem de böbrek dokularında SOD, Gpx, GR ve CAT aktiviteleri, kontrol grubu ile benomil grubu karşılaştırıldığında benomil grubunda anlamlı bir azalış, benomil grubu ile B+LA, B+C4S ve B+LA+C4S grupları karşılaştırıldığında ise üç grupta da anlamlı bir artış gözlenmektedir. Kontrol grubu ile B+LA+C4S grubundaki SODk, SODb, CATk ve CATb enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmektedir. Bu bulgular

sayesinde benomil'in karaciğer ve böbrek dokularında oksidatif strese neden olduğu, LA ve C4S'nin de bu oksidatif strese karşı koruyucu etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır. Çünkü SOD, GPx, GR ve CAT enzim aktivitelerinde gözlenen bir artış, ortamda indüklenen bir oksidatif stresin varlığının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte enzim aktivitelerindeki azalma, organizmanın oksidan gerilime karşı savunmasını zayıflattığının işaretidir (Sivaprasad vd., 2004).

Benomil'in karaciğer ve böbrek dokularının histolojisi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Selmanoğlu vd. 2001), sıçanlara 15 hafta süre ile benomil'in metaboliti olan karbendazim (150, 300 ve 600 mg/kg.gün) verilmiş ve 600 mg/kg.gün karbendazim uygulanan sıçanların karaciğerlerinde hücre infiltrasyonu, hidropik dejenerasyon, böbrek dokularında ise fibrosiz, tubular dejenerasyon ve mononuklear hücre filtrasyonu gibi histopatolojik bulgular belirlenmiştir. Benomil toksisitesi üzerine yapılan bir diğer çalışmada (Balkan ve Aktaş, 2005), 200 mg /kg.gün benomil dozu 5 gün boyunca gavaj yolu ile erkek ve dişi sıçanlara uygulanmıştır. Deney süresinin sonunda sıçanların karaciğer dokularında merkezi ven etrafındaki sinüzoidlerde genişleme, doku içinde piknotik nukleuslu hücreler ile vakuolisasyon, nukleus zarında parçalanma en sık görülen histopatolojik bulgular olarak gösterilmiştir.

LA ve hesperidin'nin koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada (Pires Das Neves vd., 2004), sodyum arsenit (As, 10 mg/kg) toksisitesine karşı hesperidin (H, 25 mg/kg) ve LA (25 mg/kg) farelere intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda; 6 farklı gruba (kontrol, As, LA, LA+As, H ve H+As) ayrılan farelerden As grubunda yer alanların karaciğer dokularında hücre infiltrasyonu, hepatositlerde şişme, hepatosit vakuolisasyonu, parenkima düzensizliği, böbrek dokularında ise tubular epitelyumde vakuolizasyon ve interstitial kanlanma gibi histopatolojik değişimler tespit edilmiştir. LA ve H grubundaki hayvanların karaciğer ve böbrek dokularının genel histolojik yapısında histopatolojik bir değişim bulunamamıştır. Bununla birlikte LA+As ve H+As grubundaki hayvanlarda ise As grubundaki tüm histapotojik değişimler bu iki grupta tespit edilmelerine rağmen oransal olarak bir azalma belirlenmiştir.

Asetaminofen'in (APAP-2.5 g/kg) sıçanlarda neden olduğu hepatik ve renal hasara karşı LA'nın (100 mg/kg) koruyucu rolünün araştırıldığı bir çalışmada (Abdel-Zaher vd., 2008), APAP uygulanmış sıçanların karaciğerlerinde vakuolizasyon ve sentrilobular nekroz, böbrek dokularında ise proksimal tübüllerde genişleme ve distal tübüllerde vakuolar dejenerasyon gözlenmiştir. Oysa APAP+LA uygulanmış sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında histopatolojik bir bulguya rastlanmamıştır.

Bizim çalışmamızda Selmanoğlu vd. (2001) ve Balkan ve Aktaş (2005)'in çalışmalarına benzer olarak benomil'in toksik etkisinin varlığı kanıtlanmaktadır. Çünkü benomil uygulanmış (B grubu) sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında histopatolojik bulgular tespit edilmiştir. Yine, bu çalışmada Pires Das Neves vd. (2004) ve Abdel-Zaher vd. (2008) yapmış olduğu çalışmalara paralel olarak LA'nın koruyucu etkisinin bir kanıtı olarak B+LA grubundaki sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında benomil grubunda tespit edilmiş patolojik bulguların kısmen düzeldiği gözlenmiştir. Bu çalışmada daha önce incelenmemiş olan, C4S'in böbrek ve karaciğer dokularındaki koruyucu etkisi de histopatolojik olarak ilk kez araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda B+C4S grubundaki sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında benomil grubunda tespit edilmiş patolojik bulguların kısmen düzeldiği ve C4S'nin de koruyuculuğu tespit edilmiştir. B+LA+C4S grubundaki sıçanların da hem LA hem de C4S'nin koruyucu etkilerinden dolayı karaciğer ve böbrek dokularında bu patolojik bulguların kısmen düzeltildiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada ilk kez;

- Subkronik uygulamada benomil'in karaciğer ve böbrek dokularında lipid peroksidasyonuna neden olarak toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.
- Lipoik asid ve kondroitin-4-sülfatın, karaciğer ve böbrek dokularında antioksidan etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir.
- Kondroitin-4-sülfat ve lipoik asidin birlikte uygulandıklarında dokulardaki antioksidan etkilerinin tek tek uygulamaya göre daha etkilili olabileceği tespit edilmiştir.
- Kondroitin-4-sülfatın ve lipoik asidin, karaciğer ve böbrek dokularında benomile bağlı olarak meydana gelen doku hasarlarına karşı kısmi bir koruyucu etkiye



sahip oldukları, iki koruyucu maddenin birlikte uygulandıklarında koruyucu etkilerinin daha fazla olabileceği tespit edilmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

ABDEL-ZAHAER O.A., ABDEL-ZAHAER R.H., MAHMOUD M.M., FARRAG M.M.Y. (2008): The potential protective role of alpha-lipoic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. *Toxicology*, 243: 261–270.

ADAM B., ARDIÇOĞLU Y. (2002): Klinik biyokimya ve analiz metodları, 1. baskı, sayfa:415. Atlas Kitapçılık, Ankara.

AEBİ H., 1984. Catalase in vitro. *Methods enzymology*, 105: 121–126.

AKKUŞ İ. (1995): Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya.

AKPINAR D., YARGIÇOĞLU P., DERİN N. (2007): The effect of lipoic acid on lipid peroxidation and visual evoked potential in rats exposed to chronic restraint stres. *Intern. J. Neurosciences*. 117:1691–1706.

AMUDHA G., JOSEPHINE A., SUDHAHAR V., VARALAKSHMI P. (2007): Protective effect of lipoic acid on oxidative and peroxidative damage in cyclosporine A-induced renal toxicity. *International Immunopharmacology*, 7: 1442–1449.

AYAZ E. ve ALPSOY H.C. (2007): Sarımsak (*Allium sativum*) ve geleneksel tedavide kullanımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*,31(2):145–149.

AYDOĞDU N., KANTER M., ERBAŞ H ve KAYMAK K. (2007): Kadmiyuma bağlı karaciğer hasarında taurin,melatonin ve asetilsisteinin nitrik oksit, lipid peroksidasyonu ve bazı antioksidanlar üzerindeki etkileri. *Erciyes Tıp Dergisi*;29(2): 89–96.

BALKAN S., AKTAÇ T. (2005): Studies on the liver functions in rats exposed to benomyl. *J. Biol. Science*, 5(5): 666–669.

BANKS D., SOLKIMAN R.I. (1997): Protective effects of antioxidants against benomyl-induced lipid peroxidation and glutathione depletion in rats. *Toxicology*, 116: 177–181.

BARALE R., SCAPOLI C., MELI C., MINUNNI M., MARAZINI A., LOPRIONE N. and BARRAI I. (1992): Cytogenetic effects of benzimidazoles in mouse bone marrow. *Mutation Research*. 300: 15–28.

BARLAS N., SELMANOĞLU G., KOÇKAYA A. and SONGÜR S. (2002): Effects of carbendazim on rat thyroid, parathyroid and adrenal glands and their hormones. *Human&Experimental Toxicology*, 21: 217–221.

BUSSE E., ZIMMER G., SCHOPOHL B., KORNHUBER B. (1992): Influence of  $\alpha$ -lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo. *Arzneim-Forsch /Drug Res.*, 42:829-832.

CARTER SD., HEINJ.F., REHNBERG G.L. (1984): Effect of benomyl on the reproductive development of male rats. *Journal of Toxicology and Enviromental Healty*, 13: 53–68.

CAMPO G.M., AVENOSO A., CAMPO S. (2004): The antioxidant and antifibrogenic effects of the glycosaminoglycans hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate in a subchronic rat model of carbon tetrachloride-induced liver fibrogenesis. *Chemico-Biological Interactions*, 148: 125–138.

CUMMINGS A.M., SANDRA T., HARRIS and REHNBERG G.L. (1990): Effects of methyl benzimidazolecarbemate during early pregnancy in the rat. *Fundamental and Applied Toxicology*, 15: 528–535.

DANE F., DALGIÇ Ö. (2005): The effects of fungicide benomyl (Benlate) on growth and mitosis in onion (*Allium cepa* L.) root apical meristem. *Acta Biologica Hungarica*. 56(1–2): 119–128.

DERE E., POLAT F. (2001): The effect of paraquat on the activity of some enzymes in different tissues of mice. *Türk J. biol.*, 25:323-332.

DOLARA P., TORICELLI F., ANTONELLI N. (1994): Cytogenetic effects on human lymphocytes of a different tissue of mice. *Türk J. Biol.*, 25:323-332.

DONATO J.L., MARCONDES S., ANTUNES E., NOGUEIRE M.D., NADER H.B., DIETRICH C.P., RENDU F., DE NUCCI G. (1996): Role of chondroitin-4sulphate as a receptor for polycation induced human platelet aggregation. *British Journal of Pharmacology*, 119: 1447–1453.

GARDINER J.A., KIRKLAND J.J., KLOPPING H.L. and SHERMAN H. (1974): Fate of benomyl in animal. *J. Agriculture Food Chemistry*, 22: 419–427.

GARTNER L.P., and HIATT J.L. (1997): Color textbook of histology. *A Division of Harcourt Brace and Company*: 346–355.

GEDİK N., KABASAKAL., ŞEHİRLİ Ö. (2005): Long-term administration of aqueous garlic extract (AGE) alleviates liver fibrosis and oxidative damage by biliary obstruction in rats. *Life Sci.*, 76 (22):2593-2606.

GOLDBERG D.M., SPOONER R.J. (1983): Methods of enzymetic analysis (Bergmeyer, H.V. Ed.) 3<sup>rd</sup> edn. *Verlag Chemie*, 3: 258–265.

GONZALEZ-PEREZ O., GONZALEZ-CASTANEDA R.E. (2006): Therapeutic perspectives on the combination of  $\alpha$ -lipoic acid and vitamin E. *Nutrition Research*, 26: 1–5.

GUTTERIDGE J.M. (1995): Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.*, 41(12):1819-1828.

GUYTON C.A., HALL J.E. (2001) (Çeviri Editörü: Çavuşoğlu H.): Tıbbi Fizyoloji. 10.Baskı. Yüce Yayınları, ANKARA. S: 265–280.

GÖZÜKARA E.M., (2001) Biyokimya. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Malatya, s:651.

GRAYCK E.N., SULİMAN H.B., PIANTADOSI S.A. (2005): Extracellular superoxide dismutase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*,37: 2466–2471.

GÜLCÜ M., DEMİRCİ A.Ş., GÜNER K.G. (2008). Siyah üzüm; zengin besin içeriği ve sağlık açısından önemi. Türkiye 10. Gıda Kongresi; 5: 179–182. Kongre Kitaplığı, Erzurum.

GÜLER Ç., ÇOBANOĞLU Z. (1997): Pestisitler. Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi. No:52, Ankara.

HA B.J., LEE J.Y. (2003): The effect of chondroitin sulfate against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity. *Biol. Pharma. Bull.* 26(5): 622–626.

HOEK J.B. and PASTORINO J.G. (2002): Ethanol, oxidative stres and cytokine-induced liver cellinjury. *Alcohol*, 27: 63–68.

IGBEDİOH S.O. and AKINYELE I.O. (1992): Effect of benomyl toxicity on some liver constituents of albino rats. *Atchives of Enviromental Health*, 47: 314–317.

JUNQUEIRE L.C., CARMEIRO J., KELLY R.O. (1995): Temel Histoloji. Çeviri Ed.: Yener Aytekin. 7. Baskı. S. 380–395. Barış Kitapevi, Ankara.

KAPLOWITZ N. (2002): Biochemical and celluar mechanisms of toxic liver injury. *Seminars Liver Disease*, 22: 137–144.

KARACA G. (2009): Lipoik asit: evrensel andioksidan. Afyon Kocatepe University *Journal of Science*, 8(1): 231-245.

KRAMER K. (2001): Nutra ceutials in health and disease prevention. *Marcel Dekker Incorporated*, New York; 8:113.

KUMARAN S., SAVITHA S., ANUSUYA D.M., PANNEESELVAM, (2004): L-carnitinie and DL- $\alpha$ -lipoic acid reverde the age-related deficit in glutathione redox state in skeletal muscle and heart tissue. *Mechenism of Ageing and Development*, 125: 507–512.

LEESON T.S., LEESON C.R. and PAPARO A.A. (1988). Text/Atlas of Histology. Ed. Martin Wonsiewichz, *Harcourt Brace Jovanovich Inc.*, 475-496.

LIANG J.F., AKAIKE T. (2000): Inhibition of nitric oxide synthesis in primary cultured mouse hepatocytes by  $\alpha$ -lipoic acid. *Chem. Biol. Interact.*, 124(1): 53-60.

LIM J. and MILLER M.G. (1996): The rol of the benomyl metaboliti carbendazim in benomyl testicular toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 142: 401–410.

LOWRY O.H, ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.

MANDA K., UENO M., MORITAKE T. and ANZAI K. (2007):  $\alpha$ -Lipoik acid attenuates x-irradiations-induced oxidative stres in mice. *Cell Biol. Toxicol.*, 23:129-137.

MARITIM A.C., SANDERS R.A., WATKINS J.B. (2003): Effects of  $\alpha$ -lipoic acid on biomarkers of oxidative stres in streptozotocin-induced diabetic rats. *J.of Nutritional Biochemistry*, 14: 288–294.

MOINI H., PACKER L. and SARIS N.E. (2002): Antioxidant and prooxidant activities of  $\alpha$ -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 182: 84–90.

NAVARI-IZZO F., QUARTACCİ M.F., SGHERRI C. (2002): Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol. Biochem.*, 40: 463-470.

OHKAWA H., OHISHI N., YAGI K. (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95:351-358.

ONAT T., EMERK K., SÖZMEN E.Y. (1995): İnsan Biyokimyası. Palme Yayıncılık. 211.Ankara. s: 212–220.

PACIFICI R.E., and DAVIES J.A. (1991): Protein and DNA repair systems in oxidative stress: The free-radical theory of aging revisited. *Gerontology*, 37: 166–180.

PACKER L., WITT E.H., and TRITSCHLER H.J. (1995): Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biol. Med.* 19: 227–250.

PACKER L., HIRAMATSU M., YOSHIKAWA T. (1999): Antioxidant Food Supplements in Human Health. ISBN: 978-0-12-543590-1. Sayfa:121.

PAGLIA D.E. and VALENTINE W.N. (1967): *J.Lab. clin. Med.*,70:158.

PATRICK L. (2002): Mercury toxicity and antioxidants: part I: Role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. *Altern. Med. Rev.*, 7(6):456-471.

PIRES DAS NEVES R.N., CARVALHO F., CARVALHO M., FERNANDES E., SOARES E., BASTOS M.L. and PEREIRA M.L. (2004): Protective activity of hesperidin and lipoic acid against sodium arsenite acute toxicity in mice. *Toxicologic Pathology*, 32: 527–535.

RAJESWARY S., MARHEW N., AKBARSH M.A. (2007): Protective effect of vitamin E against cerbandazim-induced testicular toxicity-histopathological evidences and reduced residue levels in testis and serum. *Archives of toxicology*, 81(11): 813–821.

RYBAK L.P, HUSSİN K., WHITWORTH C., SOMANI S.M. (1999): Dose depented protection by lipoic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats: antioxidant defense system. *Toxicological Sciences*, 47: 195–202.

SAKIZLI M., ATABEY N. (2006): (Çeviri Editörleri). Hücre Moleküler Yaklaşım 3. Baskı. *İzmir Tıp Kitabevi*, İzmir, s.42, 526.

SELMANOĞLU G., SONGÜR S. and KOÇKAYA E.A. (2001): Carbendazim-induced haematological, biochemical and histopotological changes to the liver and kidney of male rats. *Human&Experimental Toxicology*, 20: 625–630.

SHUKLA Y., ANTONY M. and MEHROTRA N.K. (1989): Studies on  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in rodents exposed to benomyl. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 42:301-306.

SIVAPRASAD R., NAGARAJ P., VARALAKSHMI P. (2004): Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *J. of Nutritional Biochemistry*, 15: 18–23.

SOROUR J. and LARINK O. (2000): Toxic effects of benomyl on the ultrastructure during spermatogenesis of the erthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Enviromental Safety*, 50: 180–188.

TERSE P.S., SAWANT S.G., and DALVI R.R. (1993): Benomyl toxicity in chickens. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 50:817-822.



TOKLU H.Z., HAKAN T., BİBER N., SOLAKÇOLU S., ÖĞÜNÇ A., ŞENER G. (2009): The protective effect of alpha lipoic acid against traumatic brain injury in rats. *Free Radical Research*, 43(7): 658–667.

WOOLLİAMS J.A., WIENER G., ANDERSON P.H., McMURRAY C.H. (1983): *Research in Veterinary Science*, 34: 253-256.

WORRALL J.G., WILKINSON L.S., BAYLISS M.T., EDWARDA J.C. (1994): Zonal distribution of chondroitin-4-sulphate/dermatan sulphate and chondroitin-6-sulphate in normal and diseased human synovium. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 53: 35–38.

YALÇIN A.S. (1998): Antioksidanlar. Klinik Gelişim II, 342–346.

YAPAR S. (2006): Alfa lipoik asidin rat karaciğer homojenatlarında indüklenmiş lipid peroksidasyonuna etkisi. Uzmanlık tezi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.

YILDIZ S., ÇAMSAN T. (2002): The use of vitamin E and vitamin E coated dialysis membrane during dialysis treatment. *Official Journal of the Turkish Society of Nephrology*, 11(2): 104–108.

YI X.and MAEDA N. (2005): Endogenous productiın of lipoic acid is essential for Mouse development. *American Society for Microbiology*, 25(18): 8387–8392.

### **Elektronik Kaynaklar**

<http://www.ahobart.btinternet.co.uk/biology/images/nephron.gif>

[http://www.akdeniz.edu.tr/tip/biyokimya%20an/DersNotlari/Aslan%20Aksunun\\_ders%20notlari/CRBCHEM.pdf](http://www.akdeniz.edu.tr/tip/biyokimya%20an/DersNotlari/Aslan%20Aksunun_ders%20notlari/CRBCHEM.pdf)

<http://www.answer-my-health-question.info/images/how-to-detoxify-your-liver-1.jpg>

<http://www.answers.com/topic/benomyl>

<http://www.bioengineering.canterbury.ac.nz/groups/kidney.shtml>

<http://drcevre.googlepages.com/k.catanomi3-full.jpg>

<http://www.haberlersaglikli.com/haberimg/BOBREK.gif>

[http://www.harford.edu/faculty/WRappazzo/a\\_oldsite/liver%20histology.jpg](http://www.harford.edu/faculty/WRappazzo/a_oldsite/liver%20histology.jpg)

[http://www.iupucanatomy.com/chapter\\_26.htm](http://www.iupucanatomy.com/chapter_26.htm)

<http://www.med-ed.virginia.edu/courses/cell/handouts/images/Liver4.gif>

## 7. ÖZGEÇMİŞ

03.04.1979 Kırklareli doğumluyum. İlk, orta ve liseyi Kırklarelinde okudum. Evli ve bir çocuk annesiyim. 2001 yılında T.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun olduktan sonra 2001–2004 yılları arasında T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansımı tamamladım. 2005 yılından beri T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında doktora programına devam etmekteyim.